



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques
Département Industries Agricoles et Alimentaires



THESE

pour l'obtention du diplôme de Doctorat
Option Industries Agricoles et Alimentaires

**Variabilités chimiques et activités antimicrobiennes
des huiles essentielles de *Cinnamosma* spp.
(Alternative aux antibiotiques en aquaculture de crevette)**



Par : RAZAFIMAMONJISON Dina Emile Nicolas Gaylor

Soutenu le 09 Décembre 2011

UNIVERSITE D'ANTANANARIVO
Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques
Département Industries Agricoles et Alimentaires

THESE

pour l'obtention du diplôme de Doctorat
Option Industries Agricoles et Alimentaires

Variabilités chimiques et activités antimicrobiennes
des huiles essentielles *de Cinnamosma* spp.
(Alternative aux antibiotiques en aquaculture de crevette)

Par: RAZAFIMAMONJISON Dina Emile Nicolas Gaylor

Soutenu le 09 Décembre 2011

Membres de jury :

Président : Professeur RAONIZAFINIMANANA née RAMAROSON Béatrice

Directeur de thèse : Professeur Titulaire RAMANOELINA Panja

Directeur de thèse: Docteur DANTHU Pascal

Rapporteur interne : Professeur RASOARAHONA Jean

Rapporteur externe : Professeur Titulaire RAZANAMPARANY Louisette

Examineur : Professeur RANDRIANARY Phillipe

Examineur : Professeur RAKOTOZANDRINDRAINY Raphaël

Je dédie ce travail

- 🌀 A mes parents pour l'éducation que vous m'avez donnée.
- 🌀 A ma chère et dévouée épouse qui par son amour m'a toujours soutenue et a su reconforter les enfants avec tant de sacrifice et patience.
- 🌀 A mes chers enfants, Tiavina et Diary, pour leur amour, patience, compréhension et sacrifice. Retrouvez un motif réel de fierté pour ce travail.
- 🌀 A mon frère et sœur, beau frère, belle sœur, nièce et neveu, merci pour vos encouragements.
- 🌀 A mon cher et regretté Oncle (Tonton Nest : Bandy akama) qui je sais est fier là où il est.
- 🌀 A tous ceux qui m'ont épaulé dans la réalisation de ce travail, mille mercis.

« Il m'arrive plusieurs fois par jour de réaliser à quel point ma vie extérieure et intérieure repose sur le labeur des autres, vivants et morts, et avec quelle ardeur je dois m'appliquer à donner, en retour, autant que j'ai reçu. »

Remerciements

Ce travail n'a pas pu être mené à terme sans les aides précieuses et le soutien de plusieurs personnes; nous tenons à remercier, plus particulièrement:

✍ Au Professeur RAONIZAFINIMANANA née RAMAROSON Béatrice, Enseignant chercheur et Chef de département des Industries Agricoles et Alimentaires à l'Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques pour avoir bien voulu présider le jury de cette Thèse.

Qu'elle veuille accepter mes plus vifs remerciements et ma respectueuse reconnaissance

✍ Au Professeur RANDRIANARY Philippe, Enseignant chercheur et Directeur de l'Ecole Supérieure Polytechnique d'Antananarivo, qui a bien voulu examiner ce travail.

Qu'il trouve ici l'expression de ma haute considération et de mes chaleureux remerciements

✍ Au Professeur RAKOTOZANDRINDRAINY Raphaël, Enseignant chercheur à l'Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques, qui a bien voulu examiner ce travail.

Qu'il veuille accepter ma respectueuse reconnaissance

✍ Au Professeur Titulaire RAMANOELINA Panja, Directeur de Thèse, Enseignant chercheur à l'Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques, qui malgré ses nombreuses occupations, a bien voulu prendre la peine d'encadrer et de corriger ce travail.

Qu'il reçoive ici ma très profonde reconnaissance

✍ Au Docteur DANTHU Pascal, Directeur de Thèse, Coordinateur du programme de l'URP Forêts - Biodiversité au CIRAD - FORET, par les précieux conseils autant sur la technique que sur la rédaction ont permis l'accomplissement de ce mémoire.

Qu'il trouve ici ma très haute considération

✍ Au Professeur RASOARAHONA Jean, Enseignant chercheur et Directeur de l'Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques pour avoir accepté de rapporter ce travail.

Qu'il reçoive ici l'expression de ma plus profonde gratitude

✍ Au Professeur Titulaire RAZANAMPARANY Louisette, Enseignant chercheur à la Faculté des Sciences, qui malgré ses nombreuses occupations, a bien voulu prendre la peine de rapporter ce travail.

Qu'elle trouve ici mes sincères remerciements

🌀 Au Docteur HDR SARTER Samira, qui malgré ses lourdes préoccupations a consacré beaucoup de ses précieux temps pour m'accueillir et me former au sein du laboratoire, pour l'encadrement, pour la collaboration et pour le soutien constant qu'elle m'a accordé pendant toutes ces années.

Qu'elle trouve ici mes remerciements les plus chaleureux

Mes vifs remerciements sont également adressés :

🌀 Au Docteur REYNES Max, Docteur ODOUX Eric, Monsieur LEBRUN Marc, Chercheurs CIRAD-FLHOR maison de la technologie Montpellier, de m'avoir accueilli dans leur laboratoire et apporté ses compétences, précieux conseils dans les analyses par CPG/SM.

🌀 Au Docteur HDR PETIT Thomas, Enseignant chercheur et Chef de département Génie Biologique, IUT ST Pierre, Université de La Réunion, de m'avoir encadré dans les analyses microbiologiques effectuées au sein du laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments La Réunion.

🌀 Au Mr RUEZ Philippe, Directeur de l'écloserie OSO Farming/LGA Ambovonaomby, qui a consacré beaucoup de temps pour m'initier et m'aider dans l'élevage larvaire et dans les tests en écloserie de crevettes.

🌀 Au Personnel du département IAA, DBFA

🌀 Au Personnel du FOFIFA - DRFP et du CIRAD - FORET

Merci pour votre affection et votre soutien

TABLE DES MATIERES

Glossaire.....	a
Liste des abréviations.....	c
Liste des figures.....	e
Liste des tableaux.....	g
Liste des annexes.....	i
INTRODUCTION.....	1
Partie I : Contexte général : Pôle d'Excellence Régional (PER) - Généralités sur les crevettes, sur le genre Cinnamosma et ses huiles essentielles.....	5
I Présentation du projet « Pôle d'Excellence Régional (PER) ».....	5
I.1. Thématique retenue.....	5
I.2. Objectifs scientifiques.....	6
I.3. Objectifs partenariaux.....	6
II Généralités sur les crevettes pénéides.....	7
II.1. Systématique.....	7
II.2. Etudes morphologiques.....	7
II.3. Sexualité.....	9
II.4. Cycle de vie.....	9
II.4.1. Fécondation et ponte.....	10
II.4.2. Développement larvaire.....	10
a) Phase Nauplius.....	10
b) Phase Zoé.....	10
c) Phase Mysis.....	11
d) Phase de Post-larves.....	11
II.4.3. Juvéniles.....	11
II.4.4. Adultes.....	11
II.5. Répartition bathymétrique.....	13
II.6 Etapes d'élevage.....	14
II.6.1. Ecloseries.....	14
a) Maturation.....	14
b) Ponte et éclosion.....	14
c) Elevage larvaire.....	14
II.6.2. Prégrossissement.....	15
II.6.3. Grossissement.....	16
II.7. La crevetticulture à Madagascar.....	16
II.8. Maladies et stratégies de développements.....	17
II.8.1. Maladies.....	17
a) Vibrioses.....	17
b) Hépatopancréatite nécrosante.....	17

II.8.2. Stratégies de développements	18
II.8.3. Résistance bactérienne aux antibiotiques.....	19
II.8.4. Alternatives aux antibiotiques	20
III Généralités sur <i>Cinnamosma</i> spp.	21
III.1. Dénomination des espèces.....	21
III.1.1. <i>Cinnamosma fragrans</i>	21
III.1.2. <i>Cinnamosma madagascariensis</i> et <i>Cinnamosma macrocarpa</i>	21
III.2. Biosystématique.....	22
III.3 Distribution du genre <i>Cinnamosma</i>	22
III.4. Description botanique des espèces étudiées	24
III.5. Propagation végétative de l'espèce.....	27
III.5.1. Recépage.....	27
III.5.2. Régénération naturelle	28
III.5.3. Régénération artificielle	28
III.6. Indications thérapeutiques	29
IV Généralités sur les huiles essentielles.....	30
IV.1. Historique	30
IV.2. Définition	32
IV.3. Localisation des huiles essentielles	32
IV.4. Rôles des huiles essentielles dans les plantes	33
IV.5. Caractéristiques générales des huiles essentielles.....	34
IV.6. Facteurs de variabilité des huiles essentielles	35
IV.6.1. Variété botanique.....	35
IV.6.2. Matériel végétal.....	35
IV.6.3. Processus de distillation.....	35
IV.6.4. Origine et existence de variété chimiques ou chémotype.....	36
IV.6.5. Génétique	36
IV.7. Composition chimique des huiles essentielles	36
IV.8. Utilisation des huiles essentielles	37
IV.8.1. Parfumerie et cosmétique	37
IV.8.2. Industries agro-alimentaires	37
IV.8.3. Industries chimiques	38
IV.8.4. Propriétés antimicrobiennes.....	38
V Synthèse des travaux effectués sur les huiles essentielles de <i>Cinnamosma</i> spp. ..	39
V.1. Rendement et propriétés physico-chimiques	39
V.2. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Cinnamosma fragrans</i>	40
V.3. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Cinnamosma madagascariensis</i> ..	43
V.4. Activités antimicrobiennes	44
V.5. Huile essentielle de <i>C. fragrans</i> : nouvelle alternative aux antibiotiques en aquaculture de crevette	45

Partie II : Démarches méthodologiques.....	46
I Méthodes de caractérisation des huiles essentielles de <i>Cinnamosma</i> spp.....	46
I.1. Matériel végétal	46
I.2. Localisation des sites de collecte.....	48
I.2.1 Site de Katsepy.....	49
I.2.2. Site de Tsaramandroso	49
I.2.3. Site de Tampolo	50
I.2.4. Site d'Ambohitantely.....	51
I.3. Procédure d'extraction	52
I.4. Détermination de la teneur en eau et rendement en huile	53
I.4.1. Détermination de la teneur en eau.....	53
I.4.2. Détermination du rendement en huile.....	53
I.5. Couplage Chromatographie en phase gazeuse et Spectrométrie de Masse (CPG/SM).....	54
I.6.1. Identification des constituants.....	55
I.6.2. Quantification des constituants.....	55
I.7. Détermination des caractéristiques physico- chimiques	55
I.7.1. Densité relative selon la norme NF T 75-111 /ISO 279-2000.....	55
I.7.2. Indice de réfraction selon la norme NF T 75-112 /ISO 280-2000	56
I.8. Détermination des caractéristiques organoleptiques	57
I.9. Huiles essentielles utilisées pour les analyses microbiologiques et les tests en aquaculture de crevettes.....	57
II Méthodes d'évaluation des activités antimicrobiennes des huiles essentielles de <i>Cinnamosma</i> spp. in vitro.	57
II.1. Microorganismes.....	58
II.2. Provenance des souches.....	58
II.2.1. Souches de référence	58
II.2.2. Souches sauvages isolées des larves de crevettes.....	58
a) Isolement et purification.....	58
b) Identification	59
II.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides.....	65
III Méthodes d'évaluation de l'effet des huiles essentielles dans des conditions d'élevage réelles	66
III.1. Conditions et suivis d'élevage	66
III.1.1. Réception et acclimatation des Nauplius	68
a) Comptage des Nauplius reçus.....	68
b) Ensemencement.....	68
III.1.2. Gestion des bacs et des larves (prises des paramètres).....	68
a) Observation des bacs	68
b) Observation des larves	68
c) Prises des paramètres d'élevage.....	70

III.1.3. Changement d'eau	71
III.1.4. Alimentation des larves	71
III.2. Détermination de la toxicité des huiles essentielles.....	72
III.3. Traitements à l'antibiotique et aux huiles essentielles	73
III.3.1. Détermination de l'effet des huiles essentielles sur la concentration bactérienne des larves	74
III.3.2. Evaluation du taux de survie des larves.....	75
IV . Méthodes d'analyse statistique.....	76
IV.1. Analyse en Composantes Principales (ACP).....	77
IV.1.1. Objectifs et principes.....	77
IV.1.2. Interprétations	77
IV.2. Classification Ascendante Hiérarchique (CAH).....	78
IV.2.1. Objectifs et principes.....	78
IV.2.2. Interprétations	78
IV.3. Analyse Factorielle Discriminante (AFD).....	78
IV.3.1. Objectifs et principes.....	79
IV.3.2. Interprétations	79
IV.4. L'analyse de la variance (ANOVA).....	79
IV.4.1. Objectif et principe	79
IV.4.2. Conditions d'application	79
IV.4.3. Interprétation du test	80
IV.5. Test de Kruskal Wallis	81
IV.6. Test de corrélation selon Spearman	81
PARTIE III : Composition chimique des huiles essentielles de <i>C. fragrans</i> et <i>C. madagascariensis</i> – Analyses statistiques des données.....	83
I. Huiles essentielles de <i>Cinnamosma fragrans</i>	83
I.1. Composition chimique des huiles essentielles de <i>Cinnamosma fragrans</i>	83
I.2. Analyse en Composantes Principales (<i>C. fragrans</i>)	86
I.2.1. Test de sphéricité de Bartlett (<i>C. fragrans</i>)	87
I.2.2. Valeurs propres en ACP (<i>C. fragrans</i>)	87
I.2.3. Caractérisation des variables et des individus (<i>C. fragrans</i>)	88
I.3. Classification Ascendante Hiérarchique (<i>C. fragrans</i>)	90
I.4. Analyse Factorielle Discriminante (<i>C. fragrans</i>)	91
I.4.1. Test de Lambda de Wilks (<i>C. fragrans</i>)	91
I.4.2. Valeurs propres en AFD (<i>C. fragrans</i>)	91
I.4.3. Description des classes en AFD (<i>C. fragrans</i>)	92
I.4.4. Caractérisation des groupes en AFD (<i>C. fragrans</i>)	92
I.5. Caractérisation chimique de chaque chémotype de l'huile essentielle de <i>C. fragrans</i>	94
I.5.1. Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles de <i>C. fragrans</i>	95

I.5.2. Evaluation du rendement en huile essentielle de <i>C. fragrans</i>	95
I.5.3. Caractéristiques physico – chimiques des huiles essentielles de <i>C. fragrans</i>	96
I.6. Influence de la date de récolte pour chaque chémotype identifié (<i>C. fragrans</i>)	96
I.6.1. Evolution de la composition chimique de chaque chémotype de l'huile essentielle de <i>C. fragrans</i> au cours de l'année	96
I.6.2. Evolution des teneurs en constituants principaux de chaque chémotype de l'huile essentielle de <i>C. fragrans</i> au cours de l'année.	105
II. Huiles essentielles de <i>Cinnamosma madagascariensis</i>	106
II.1. Composition chimique des huiles essentielles de <i>C. madagascariensis</i>	106
II.2. Analyse en Composantes Principales (<i>C. madagascariensis</i>).....	109
II.2.1. Test de sphéricité de Bartlett (<i>C. madagascariensis</i>).....	110
II.2.2. Valeurs propres en ACP (<i>C. madagascariensis</i>).....	110
II.2.3. Caractérisation des variables et des individus en ACP (<i>C. madagascariensis</i>)	111
II.3. Classification Ascendante Hiérarchique (<i>C. madagascariensis</i>).....	113
II.4. Analyse Factorielle Discriminante (<i>C. madagascariensis</i>).....	114
II.4.1. Test de Lambda de Wilks <i>C. madagascariensis</i>	114
II.4.2. Valeurs propres en AFD (<i>C. madagascariensis</i>).....	114
II.4.3. Description des groupes (<i>C. madagascariensis</i>).....	115
II.4.4. Caractérisation des groupes (<i>C. madagascariensis</i>).....	115
II.5. Caractérisation chimique de chaque chémotype de l'huile essentielle de <i>C. madagascariensis</i>	117
II.5.1. Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles de <i>C. madagascariensis</i>	117
II.5.2. Evaluation du rendement en huile essentielle de <i>C. madagascariensis</i>	118
II.5.3. Caractéristiques physico – chimiques des huiles essentielles de <i>C. madagascariensis</i>	118
II.6. Influence de la date de récolte pour chaque chémotype identifié (<i>C. madagascariensis</i>).....	119
II.6.1 Evolution de la composition chimique de chaque chémotype pour l'huile essentielle de <i>C. madagascariensis</i> durant l'année	119
II.6.2. Evolution des teneurs en constituants principaux de chaque chémotype pour l'huile essentielle de <i>C. madagascariensis</i> au cours de l'année.....	124
III. Comparaison de la composition chimique des huiles essentielles de <i>C. fragrans</i> et <i>C. madagascariensis</i>	125
III.1. Analyse en Composantes Principales (<i>Cinnamosma</i> spp.)	125
III.1.1. Test de sphéricité de Bartlett (<i>Cinnamosma</i> spp.)	125
III.1.2. Valeurs propres en ACP (<i>Cinnamosma</i> spp.)	125
III.1.3. Caractérisation des variables et des individus (<i>Cinnamosma</i> spp.)	126
III.2. Classification Ascendante Hiérarchique (<i>Cinnamosma</i> spp.)	128
III.3. Analyse Factorielle Discriminante (<i>Cinnamosma</i> spp.).....	129
III.3.1. Test de Lambda de Wilks (<i>Cinnamosma</i> spp.)	129

III.3.2. Valeurs propres en AFD (<i>Cinnamosma</i> spp.)	129
III.3.3. Description des groupes (<i>Cinnamosma</i> spp.)	130
III.3.4. Caractérisation des groupes (<i>Cinnamosma</i> spp.)	130
IV. Discussions des résultats.....	133
V. Conclusion partielle.....	136
PARTIE IV : Propriétés biologiques et tests en éclosion de crevettes de chaque chémotype	137
I. Résultats des analyses microbiologiques <i>in vitro</i>	137
I.1. Identification des isolats de larves de l'éclosion	137
I.1.1. Identification préliminaire.....	137
I.1.2. Identification des isolats avec la galerie API 20 NE	138
I.2. Concentrations minimales inhibitrices de chaque chémotype et leurs composants purs vis-à-vis des souches de référence.....	139
I.3. Concentrations minimales inhibitrices de chaque chémotype et leurs composants purs vis-à-vis des souches bactériennes isolées de l'éclosion	141
II. Résultats des tests en éclosion de crevettes.....	142
II.1. DL 50 des quatre stades larvaires avec les trois huiles essentielles.....	142
II.1.1. Différence significative entre la DL 50 des trois huiles essentielles, quelque soit le stade.....	143
a) Statistique descriptive (effet huile essentielle).....	143
b) Test de Kruskal Wallis sur la DL 50 (effet huile essentielle)	143
II.1.2. Différence significative entre la DL 50 des quatre stades, quelque soit l'huile essentielle	144
a) Statistique descriptive (effet stade).....	144
b) Test de Kruskal Wallis sur DL 50 (effet stade)	145
II.2. Comparaison de l'effet des trois huiles essentielles, antibiotique et témoin sur la concentration bactérienne et le taux de survie des larves	146
II.2.1. Evolution de la concentration bactérienne des larves ensemencés sur Marine agar (Flore Mésophile Totale : FMT) durant 18 jours d'élevage.....	146
a) Test de Kruskal Wallis sur la concentration en FMT	147
b) Répartition des cinq traitements selon la concentration en FMT	147
II.2.2. Evolution de la concentration bactérienne des prélèvements larvaires ensemencés sur TCBS (<i>Vibrio</i> sp.) durant 18 jours d'élevage.....	148
a) Test de Kruskal Wallis sur la concentration en <i>Vibrio</i> sp.	149
b) Répartition des cinq traitements selon la concentration en <i>Vibrio</i> sp.....	149
II.2.2. Evolution du taux de survie des larves pendant 18 jours d'élevage	150
a) Test de Kruskal Wallis sur le taux de survie.....	151
b) Répartition des cinq traitements selon le taux de survie.	151
II.3 Corrélation entre la concentration bactérienne (FMT et <i>Vibrio</i> sp.) et le taux de survie des larves.....	152
II.3.1. Corrélation entre la concentration en FMT et le taux de survie des larves ..	152

II.3.2. <i>Corrélation entre la concentration en Vibrio sp. et le taux de survie des larves</i>	154
III. <i>Discussions des résultats</i>	155
IV. <i>Conclusion partielle</i>	158
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	159
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	164
ANNEXES	i

Glossaire

Alternes : Disposition de diverses pièces qui sont placées alternativement, et non en face l'une de l'autre.

Androcée : Ensemble des étamines, organes mâles d'une fleur.

Anthère : Partie globuleuse qui surmonte l'étamine des phanérogames dans la quelle se forme les grains de pollen et qui s'ouvre à maturité pour laisser ceux-ci à s'échapper.

Axillaire : Naissant à la base d'une feuille.

Barochore : Se dit d'une plante dont le mode de dissémination des graines se fait par simple pesanteur de leur fruit.

Bifides : Fendus en deux.

Biotope : Milieu biologique déterminé offrant à une biocénose des conditions d'habitat relativement stables.

Bractée : Petite feuille généralement différente des autres feuilles, à la base du pédoncule floral.

Caducue : Se dit d'un feuillage (ou chaque feuille) d'un végétale destiné à tomber en cours d'année, après avoir rempli sa fonction, ce qui se produit normalement à l'approche de la mauvaise saison.

Calice : Ensemble des sépales d'une fleur.

Coriaces : Ayant la consistance du cuir.

Le chémotype (ou chimiotype) : Désigne une entité chimique distincte au sein d'une même espèce. Chaque espèce possède un équipement enzymatique qui oriente vers la formation d'un constituant majoritaire ou de plusieurs constituants bio synthétiquement liés. Ce terme s'applique à tout type de composés chimique appartenant au métabolite secondaire. Les huiles essentielles tiennent une place prépondérante dans ce phénomène.

Corolle : Ensemble des pétales d'une fleur, souvent colorés.

Décurrent : Qui se prolonge au-delà du point d'insertion habituel.

Décoction : Action de faire bouillir dans l'eau une substance pour en extraire les principes solubles.

Endémique : Qualifie une plante native d'une région déterminée et que l'on ne trouve pas ailleurs en site naturel.

Epicarpe : Pellicule qui recouvre le fruit, communément appelé peau.

Fébriles : Qui a rapport à la fièvre.

Folioles : Chaque division d'une feuille composée.

Glabre : Se dit d'un orange dépourvu de poils.

Géminé : Disposé en paire

Inflorescence : Mode de regroupement des fleurs sur une plante. Les principaux types d'inflorescence sont : grappe, épi, ombelle, capitule, cyme, corymbe.

Infusion : Action de tremper une substance végétale dans un liquide dont on veut extraire les principes solubles.

Lancéolé : Se dit d'un organe terminé en forme de fer de lance étroit et rétréci en pointe.

Limbe : Partie principale élargie et étalée de la feuille.

Lobe : Division profonde et généralement arrondie d'une feuille, d'un pétiole.

Mésocarpe : Zone médiane d'un fruit, entre l'épiderme et le noyau ou les graines.

Nervure : Filet ramifié et saillant sur le limbe d'une feuille, dont la disposition détermine la forme du limbe.

Oblong : Plus long que large et arrondi aux deux extrémités.

Obovale : Ovale avec plus grande largeur en haut.

Pédoncule : Queue d'une fleur ou d'un fruit.

Pétale : Chacun des éléments qui composent la corolle d'une fleur, formés d'un limbe coloré et d'un onglet qui les rattache au calice.

Pétiole : Partie rétrécie reliant le limbe d'une feuille à la tige, près de laquelle elle s'élargit souvent en une graine.

Sempervirente : Qui conserve un feuillage vert toute l'année.

Sépale : Pièce florale habituellement vert, située au dessus de la corolle.

Sessile : Caractère d'une feuille, d'une fleur ou d'un organe dépourvu de tige et fixé directement et sans support.

Terne : Qui reflète peu ou mal la lumière.

Zoochore : Se dit d'une plante dont le mode de dissémination des graines se fait par l'intermédiaire d'animaux.

Liste des abréviations

ACP	Analyse en composantes principales
AFD	Analyse Factorielle Discriminante
AFNOR	Association Française de Normalisation
C	Cinnamosma
°C	degré Celsius
CAH	Classification hiérarchique ascendante
CAM	Ambohitantely
CAR	Oxyde de caryophyllène
CFU/ml	Colonie formatrice d'unité par millilitre
CIN	1,8 cinéole
CIRAD	Centre de coopération Internationale en recherche agronomique pour le développement
CIT	Citral (mélange de néral et géraniol)
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CPG/SM	Chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse
DDL	Degré de liberté
DL	Dose létale
DO	Densités optiques
E	Antibiotique (Erythromycine)
EDTA	Ethyl diamine tetra acétique
FAO	Food and agriculture organization
FMT	Flore Mésophile Totale
FOFIFA	Centre National de Recherches Appliquées au Développement Rural (CENRADERU)
GER	Acide gérannique
GPS	Global positioning system
H ₀	Hypothèse nulle
H _a	Hypothèse alternative
HE	Huiles essentielles
HPV	Hepatopancreatic parvovirus
IHHNV	Infectious hypodermal and hematopoeitic necrosis virus
IR	Indice de rétention
K	Katsepy
LGA	Les gambas de l'Ankarana
LIN	linalol
LSNV	Laem Singh virus
MA	Marine agar
Max	Maximum
MBV	Monodon baculovirus
Min	Minimum
MOV	Mourilyan virus
Moy	Moyenne
MSGs	Monodon slow growth syndrome
N	Nauplius
NIST	National institute of standards and technology

<i>OMS</i>	<i>Organisation mondiale de la santé</i>
<i>OSO</i>	<i>Overseas seafood operations</i>
<i>P</i>	<i>Photobacterium</i>
<i>p/p</i>	<i>Poids/poids</i>
<i>PL</i>	<i>Post-larve</i>
<i>Rdt</i>	<i>Rendement</i>
<i>SD</i>	<i>Standard déviation</i>
<i>T</i>	<i>Tsaramandroso</i>
<i>TCBS</i>	<i>Thiosulfate citrate bile saccharose agar</i>
<i>TPL</i>	<i>Tampolo</i>
<i>Tr</i>	<i>trace</i>
<i>TSV</i>	<i>Taura syndrome virus</i>
<i>URP</i>	<i>Unité de Recherche en Partenariat (Cirad, Fofifa, Université)</i>
<i>V</i>	<i>Vibrio</i>
<i>v/v</i>	<i>volume/volume</i>
<i>WSSV</i>	<i>White-spot syndrome virus</i>
<i>YHV</i>	<i>Yellow-head virus</i>
<i>Z</i>	<i>Zoé</i>

Liste des figures

Figure 1 : <i>Penaeus monodon</i> (Motoh, 1981)	7
Figure 2 : Morphologie externe des Pénéides (Motoh, 1981).....	8
Figure 3 : Différents stades larvaires (Motoh, 1981)	12
Figure 4 : Répartition haline et bathymétrie des Pénéides (Motoh, 1981).....	13
Figure 5 : Pied adulte de <i>Cinnamosma</i>	22
Figure 6 : Rameau fructifère du <i>Cinnamosma</i> (Perrier de la Bâthie, 1954).....	26
Figure 7 : Rejets de souche de <i>Cinnamosma</i>	27
Figure 8 : Régénération du <i>Cinnamosma</i> par graine	28
Figure 9 : Conservation des feuilles collectées.....	47
Figure 10 : Marquage des individus.....	47
Figure 11 : Carte de localisation des zones d'études.....	48
Figure 12 : Courbe ombrothermique de Gaussen de Katsepy	49
Figure 13 : Courbe ombrothermique de Gaussen de Tsaramandroso	50
Figure 14 : Courbe ombrothermique de Gaussen de Tampolo	51
Figure 15 : Courbe ombrothermique de Gaussen d'Ambohitantely.....	51
Figure 16 : Dispositif d'hydrodistillation.....	52
Figure 17 : Appareil de spectrométrie de masse du type Network 5973.....	54
Figure 18: Pycnomètre	56
Figure 19: Réfractomètre.....	56
Figure 20: Coloration de gram.....	60
Figure 21 : Recherche de catalase (formation de bulle).....	61
Figure 22 : Recherche de l'oxydase	62
Figure 23 : Identification par API-20	64
Figure 24 : Dispositif expérimental pour les analyses <i>in vivo</i>	67
Figure 25 : Schéma simplifié du Dispositif expérimental pour les analyses <i>in vivo</i>	67
Figure 26 : Boîte de prélèvement des larves avec un tamis.....	69
Figure 27 : Type de broyeur	74
Figure 28 : Comptage des larves.....	75
Figure 29 : Cercle de corrélation des variables dans l'ACP (<i>C. fragrans</i>).....	88
Figure 30 : Répartition des 27 individus de <i>C. fragrans</i> en quatre groupes.....	89
Figure 31 : Dendrogramme de la classification des 27 individus de <i>C. fragrans</i>	90
Figure 32: Représentation graphique des variables en AFD pour <i>C. fragrans</i>	92
Figure 33: Représentation graphique des individus en AFD pour <i>C. fragrans</i>	93
Figure 34: Comparaison des groupes de constituants chimiques des huiles essentielles de <i>C. fragrans</i>	93
Figure 35: Evolution des teneurs en linalol, en 1,8 cinéole, en néral, en géraniol et en acide gérannique au cours de l'année.	105
Figure 36: Cercle de corrélation des variables dans l'ACP (<i>C. madagascariensis</i>).....	111

Figure 37: Répartition des 20 individus de <i>C. madagascariensis</i> en deux groupes.....	112
Figure 38: Dendrogramme de la classification des 20 individus de <i>C. madagascariensis</i> ...	113
Figure 39: Représentation graphique des variables en AFD pour <i>C. madagascariensis</i>	115
Figure 40: Représentation graphique des individus en AFD pour <i>C. madagascariensis</i>	116
Figure 41: Comparaison des groupes de constituants chimiques des huiles essentielles de <i>C. madagascariensis</i>	116
Figure 42: Evolution des teneurs en caryophyllène oxyde et en 1,8 cinéole durant l'année.	124
Figure 43: Cercle de corrélation des variables dans l'ACP (<i>Cinnamosma</i> spp.).....	126
Figure 44: Répartition des 47 individus de <i>Cinnamosma</i> spp. en deux groupes	127
Figure 45: Dendrogramme de la classification des 47 individus de <i>Cinnamosma</i> spp.	128
Figure 46: Représentation graphique des variables en AFD pour <i>Cinnamosma</i> spp.	130
Figure 47: Représentation graphique des individus en AFD pour <i>Cinnamosma</i> spp.....	131
Figure 48: Comparaison des groupes de constituants chimiques des huiles essentielles de <i>C. fragrans</i> et <i>C. madagascariensis</i>	131
Figure 49 : Evolution de la concentration bactérienne (log CFU/ml) obtenue sur Marine agar (FMT) avec des larves traitées par des huiles essentielles, antibiotique et témoin pendant 18 jours d'élevage (Valeurs correspondant à la moyenne de trois répétitions).	146
Figure 50 : Evolution de la concentration bactérienne (log CFU/ml) obtenue sur TCBS (<i>Vibrio</i> sp.) avec des larves traités par les huiles essentielles, antibiotique et témoin pendant 18 jours d'élevage (Valeurs correspondant à la moyenne de trois répétitions).	148
Figure 51 : Evolution du taux de survie des larves dans les bacs traités avec les huiles essentielles, antibiotique et témoin pendant 18 jours d'élevage (Valeurs correspondant à la moyenne de trois répétitions).	150
Figure 52 : Concentration en FMT et le taux de survie des larves	153
Figure 53 : Concentration en <i>Vibrio</i> sp. et le taux de survie des larves.....	154

Liste des tableaux

Tableau 1 : Description morphologique des espèces étudiées (Humbert, 1954).....	24
Tableau 2 : Rendements et les caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de <i>Cinnamosma</i> sp	39
Tableau 3 : Composition chimique des huiles essentielles de <i>C. fragrans</i> (% relatif) (Randrianarivelo et al., 2009)	40
Tableau 4 : Composition chimique des huiles essentielles de <i>C. fragrans</i> trouvée par d'autres auteurs (% relatif)	42
Tableau 5 : CMI et CMB des huiles essentielles de <i>C. fragrans</i> (Randrianarivelo et al. 2009)	44
Tableau 6 : Localisation sites de collecte.....	48
Tableau 7 : Souches de références utilisées pour le test antimicrobien.....	58
Tableau 8 : Nombre total de souches isolées	59
Tableau 9 : Lecture de la galerie miniaturisée Api 20 NE	64
Tableau 10 : Paramètres contrôlés.....	70
Tableau 11 : Séquence alimentaire des larves	72
Tableau 12: Composition chimique de l'huile essentielle de <i>C. fragrans</i> (% relatif).....	83
Tableau 13: Test de sphéricité de Bartlett (<i>C. fragrans</i>).....	87
Tableau 14 : Valeurs propres des axes principaux en ACP (<i>C. fragrans</i>)	87
Tableau 15: Test de Lambda de Wilks (<i>C. fragrans</i>).....	91
Tableau 16: Valeurs propres et pourcentage de variance en AFD (<i>C. fragrans</i>).....	91
Tableau 17: Effectifs des groupes formés (<i>C. fragrans</i>).....	92
Tableau 18: Caractéristiques organoleptiques de chaque chémotype de l'huile essentielle de <i>C. fragrans</i>	95
Tableau 19: Rendement en huile essentielle de <i>C. fragrans</i>	95
Tableau 20: Caractéristiques physico – chimiques des huiles essentielles de <i>C. fragrans</i> ...	96
Tableau 21: Evolution de la composition chimique pour le chémotype à linalol au cours de l'année (% relatif).	97
Tableau 22 : Evolution de la composition chimique pour le chémotype à 1,8 cinéole au cours de l'année (% relatif).....	99
Tableau 23: Evolution de la composition chimique pour le chémotype à néral et géraniol au cours de l'année (% relatif).....	101
Tableau 24: Evolution de la composition chimique pour le chémotype à acide gérannique au cours de l'année (% relatif).....	103
Tableau 25: Composition chimique de l'huile essentielle de <i>C. madagascariensis</i> (% relatif).	106
Tableau 26: Test de sphéricité de Bartlett (<i>C. madagascariensis</i>).....	110
Tableau 27 : Valeurs propres des axes principaux en ACP (<i>C. madagascariensis</i>).....	110
Tableau 28: Test de Lambda de Wilks (<i>C. madagascariensis</i>)	114
Tableau 29: Valeurs propres et pourcentage de variance en AFD (<i>C. madagascariensis</i>) .	114
Tableau 30 : Effectifs des groupes formés (<i>C. madagascariensis</i>)	115

Tableau 31: Caractéristiques organoleptiques de chaque chémotype de l'huile essentielle de <i>C. madagascariensis</i>	117
Tableau 32: Rendement en huile essentielle de <i>C. madagascariensis</i>	118
Tableau 33: Caractéristiques physico – chimiques des huiles essentielles de <i>C. madagascariensis</i>	118
Tableau 34 : Evolution de la composition chimique pour le chémotype à caryophyllène oxyde au cours de l'année (% relatif).	120
Tableau 35: Evolution de la composition chimique pour le chémotype à 1,8 cinéole au cours l'année (% relatif).	122
Tableau 36: Test de sphéricité de Bartlett (<i>Cinnamosma</i> spp.).....	125
Tableau 37 : Valeurs propres des axes principaux en ACP (<i>Cinnamosma</i> spp.)	125
Tableau 38: Test de Lambda de Wilks (<i>Cinnamosma</i> spp.).....	129
Tableau 39: Valeurs propres et pourcentage de variance en AFD (<i>Cinnamosma</i> spp.)	129
Tableau 40: Effectifs des groupes formés (<i>Cinnamosma</i> spp.).....	130
Tableau 41: Caractéristiques des isolats de larves de l'écloserie	137
Tableau 42: Identification des isolats de larves avec la galerie API 20 NE pour chaque traitement suivant les jours d'élevage J_0 , J_9 , J_{18}	138
Tableau 43: Principaux constituants chimiques de l'huile essentielle de <i>C. fragrans</i> et de <i>C. madagascariensis</i> (% relatif).	139
Tableau 44 : Concentrations minimales inhibitrices de chaque chémotype et leurs composants purs vis-à-vis des souches de référence (mg/ml).....	140
Tableau 45 : Concentrations minimales inhibitrices de chaque chémotype et leurs composants purs vis-à-vis des souches isolées de l'écloserie (mg/ml).....	141
Tableau 46 : DL 50 des quatre stades larvaires avec les trois huiles essentielles (mg/l) .	142
Tableau 47 : Minimum, maximum et moyenne de la DL 50 de chaque huile essentielle (mg/l)	143
Tableau 48 : Résultat du test de Kruskal Wallis sur la DL 50 (effet huile essentielle)	143
Tableau 49 : Répartition des huiles essentielles selon la DL 50	144
Tableau 50 : Minimum, maximum et moyenne de la DL 50 de chaque stade (mg/l)	144
Tableau 51 : Résultat du test de Kruskal Wallis sur la DL 50 (effet stade)	145
Tableau 52 : Répartition des quatre stades selon la DL 50.....	145
Tableau 53 : Résultat du test de Kruskal Wallis sur la concentration en FMT.....	147
Tableau 54 : Répartition des cinq traitements selon la concentration en FMT	147
Tableau 55 : Résultat du test de Kruskal Wallis sur la concentration en <i>Vibrio</i> sp.	149
Tableau 56 : Répartition des cinq traitements selon la concentration en <i>Vibrio</i> sp.	149
Tableau 57 : Résultat du test de Kruskal Wallis sur le taux de survie	151
Tableau 58 : Répartition des cinq traitements selon le taux de survie.....	151
Tableau 59 : Matrice de corrélation de Spearman (concentration en FMT et le taux de survie des larves).....	153
Tableau 60 : Matrice de corrélation de Spearman (concentration en <i>Vibrio</i> sp. et le taux de survie des larves)	154

Liste des annexes

<i>Annexe 1 : Hydrodistillation</i>	<i>i</i>
<i>Annexe 2 : Humidité</i>	<i>i</i>
<i>Annexe 3 : Rendement par rapport à la matière sèche</i>	<i>ii</i>
<i>Annexe 4 : Couplage Chromatographie en phase gazeuse et Spectrométrie de Masse</i>	<i>ii</i>
<i>Annexe 5 : Densité relative</i>	<i>ii</i>
<i>Annexe 6 : Indice de Réfraction</i>	<i>iii</i>
<i>Annexe 7 : Questionnaire sur les caractéristiques organoleptiques</i>	<i>iii</i>
<i>Annexe 8 : Galerie API 20NE</i>	<i>iv</i>
<i>Annexe 9 : Toxicité des huiles essentielles</i>	<i>v</i>
<i>Annexe 10 : Concentration bactérienne des prélèvements larvaires</i>	<i>vi</i>
<i>Annexe 11 : Comptage des larves (taux de survie)</i>	<i>vi</i>
<i>Annexe 12 : Analyse en Composantes Principales (ACP) avec XLSTAT (manuel XLSTAT 2011)</i>	<i>vii</i>
<i>Annexe 13 : Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) avec XLSTAT (manuel XLSTAT 2011)</i>	<i>xii</i>
<i>Annexe 14: Analyse Factorielle Discriminante avec XLSTAT (manuel XLSTAT 2011)</i>	<i>xiv</i>
<i>Annexe 15 : ANOVA suivie de tests de comparaisons multiples avec XLSTAT</i>	<i>xviii</i>
<i>Annexe 16 : Test de Kruskal Wallis avec XLSTAT</i>	<i>xxii</i>
<i>Annexe 17 : Matrice de données (C. fragrans)</i>	<i>xxiv</i>
<i>Annexe 18 : Matrice de données (C. madagascariensis)</i>	<i>xxv</i>
<i>Annexe 19 : Matrice de données (Cinnamosma sp.)</i>	<i>xxvi</i>
<i>Annexe 20 : Matrice de données (DL 50 trois huiles essentielles)</i>	<i>xxviii</i>
<i>Annexe 21 : Matrice de données (DL 50 quatre stades)</i>	<i>xxviii</i>
<i>Annexe 22 : Matrice de données (Concentration en FMT log CFU/ml)</i>	<i>xxix</i>
<i>Annexe 23 : Matrice de données (Concentration en Vibrio sp. log CFU/ml)</i>	<i>xxx</i>
<i>Annexe 24 : Matrice de données (Taux de survie arc sin)</i>	<i>xxxi</i>

INTRODUCTION

L'aquaculture de crevettes trouve son apogée et s'éparpille dans plusieurs régions du monde. Pour Madagascar, l'activité est récente, âgée d'une décennie environ. Face à la demande croissante du marché, depuis ces dernières années, de grandes sociétés s'implantent dans les zones favorables et contribuent au développement de la filière crevetticole dans la grande île.

Les maladies de crevette sont parmi les plus grandes préoccupations des exploitants (Van Nguyen, 2002). La Plupart des entreprises crevettières pratiquent l'élevage intensif, une grande quantité d'aliments et antibiotiques ont été utilisés pour augmenter la production et protéger les crevettes contre les maladies d'origine virale (EJF, 2003). Cependant, des résidus de ces antibiotiques et aliments sont observés dans l'eau d'élevage causant la pollution de l'eau (Le *et al.*, 2003). Par ailleurs, plusieurs études ont montré que beaucoup d'antibiotiques persistent dans le bassin d'élevage pendant plusieurs mois après administration (Björklund *et al.*, 1991 ; Lunestad *et al.*, 1995 ; Pouliquen *et al.*, 1996 ; Capone *et al.* 1996 ; Weston, 1996 ; Herwig *et al.* 1997 ; Hirsch *et al.*, 1999; Miranda *et al.*, 2002). Ces résidus ont affecté sur la flore microbienne et entraîné la résistance des bactéries aux antibiotiques (Hektoen *et al.*, 1995; Tendencia *et al.*, 2002). En effet, l'utilisation des antibiotiques en aquaculture dans le monde a été associée à l'émergence de résistances bactériennes. Celles-ci diminuent l'efficacité des antibiotiques et perturbent les équilibres microbiens dans les écosystèmes concernés.

En outre, des agences internationales recommandent que les antibiotiques doivent être limités aux buts thérapeutiques et à des usages de préventions contre les maladies seulement (Gesamp, 1997 ; FAO, 2005). De plus, ces dix dernières années, il y a eu une pression considérable des consommateurs pour réduire ou éliminer les additifs chimiquement synthétisés dans leurs produits alimentaires (Skocibusic *et al.*, 2006).

Face à ce défi, la recherche de nouvelles sources d'ingrédients, des additifs et des antibiotiques naturels dans l'aquaculture de crevette préoccupent les chercheurs. Une façon alternative pour remplacer les antibiotiques conventionnels utilisés dans l'aquaculture de crevette était l'utilisation des extraits de plantes comme agents inhibiteurs de croissance bactérienne et immunostimulants des systèmes de défense de l'hôte (Direkbusarakom *et al.*, 1998; Dorman *et al.*, 2000; Citarasu *et al.*, 2002 ; Leano *et al.*, 2007; Yeh *et al.*, 2009). L'avantage principal de ces extraits consistait en ce qu'ils pourraient être utilisés dans n'importe quelle alimentation (Viuda-Martos *et al.*, 2008).

La diversité biologique est un label dont jouit Madagascar. La grande île possède des écosystèmes particuliers parmi les plus riches du monde avec un taux d'endémicité exceptionnel de près de 80 %. En ce qui concerne les huiles essentielles, produits naturels extraits à partir des feuilles et des fruits des plantes aromatiques, le pays recèle de véritables sources de matières premières. Actuellement, environ 71 espèces aromatiques sont exploitées, dont 30 sont endémiques (Théron *et al.*, 1994). Le genre *Cinnamosma* (C.), endémique à Madagascar, appartenant à la famille des *Canellacées*, connu sous le nom vernaculaire « *Motrobeatiniana*, *Mandravasarotra* », fait partie de ces plantes. Il présente des feuilles persistantes qui peuvent être identifiées par leur feuillage plutôt épais, glabre et stipulant. Ce genre comprend trois espèces d'arbustes ou d'arbres : *C. fragrans*, distribué dans les parties nord, nord-ouest et centrales ouest de Madagascar ; *C. macrocarpa* et *C. madagascariensis* qui sont localisés dans l'est, sud-est et dans la partie du sud de cette île (Harinantenaina *et al.*, 2006; Harina ntenaina *et al.*, 2007; Harinantenaina *et al.*, 2008). Les fruits et les feuilles sont très aromatiques et produisent des huiles essentielles (Perrier de la Bâthie, 1954). Les travaux menés par Randrianarivelo *et al.* (2009) sur l'analyse de la composition chimique des huiles essentielles de *C. fragrans* provenant deux sites différents ont montré l'existence de deux différents types chimiques: le linalol pour Tsaramandroso et le 1,8 cinéole pour Mariarano. Par ailleurs, des variabilités des constituants majoritaires des huiles essentielles de *C. fragrans* sont constatées. En effet, une teneur élevée en linalol est remarquée dans l'huile essentielle de Schulte *et al.* (1972) alors que le 1,8 cinéole et le sabinène dominant dans les échantillons décrits par Arnal-Schnebelen *et al.* (2007) et Tucker *et al.* (2008).

Cinnamosma présente des vertus curatives très vastes, et est utilisée dans la médecine traditionnelle contre les maladies de l'appareil respiratoire, les parasitoses intestinales, la maladie du foie, la syphilis (Pernet *et al.*, 1957; Schulte *et al.*, 1972) et la malaria (Milijaona *et al.*, 2003). Son huile essentielle présentent un large spectre d'activité antibactérienne et pourrait être une alternative aux antibiotiques dans l'aquaculture de crevettes (Randrianarivelo *et al.*, 2009 ; Randrianarivelo *et al.*, 2010).

C'est dans ce contexte que le présent travail intitulé « **Variabilités chimiques et activités antimicrobiennes des huiles essentielles de *Cinnamosma* spp. (Alternative aux antibiotiques en aquaculture de crevette)** » a été entrepris dans le cadre du projet « Pôle d'Excellence Régional » (PER), réalisé avec l'Université d'Antananarivo, l'Université de La Réunion, URP/FB, le CIRAD, le FOFIFA et l'OSO Farming (LGA).

Ainsi, l'objectif général de cette étude est de substituer les antibiotiques conventionnels utilisés dans l'aquaculture de crevette par l'utilisation des huiles essentielles de feuilles *C. fragrans* et *C. madagascariensis*. Pour bien mener notre travail cet objectif général a été divisé en deux sous objectifs : le premier consiste à caractériser les huiles essentielles de deux espèces de *Cinnamosma* spp. en terme de composition chimique et activités antimicrobiennes *in vitro* et le second consiste à tester les extraits actifs dans une éclosérie de crevettes pour évaluer leur efficacité dans des conditions d'élevage réelles en remplacement des antibiotiques chimiques.

Pour atteindre ces objectifs, quatre grandes parties sont réalisées dans le cadre de cette thèse. La première partie qui montre le contexte général de l'étude englobe deux chapitres dont le premier présente le projet Pôle d'Excellence Régional (PER) et le second donne les généralités sur les crevettes, sur le genre *Cinnamosma* et ses huiles essentielles. La deuxième partie développe les démarches méthodologiques en commençant par les méthodes de caractérisation des huiles essentielles ensuite les méthodes d'analyse microbiologique *in vitro*, puis méthodes d'évaluation de l'efficacité des huiles dans des conditions d'élevage réelles et enfin les méthodes d'analyses statistiques. La troisième partie illustre la composition chimique des huiles essentielles de *Cinnamosma* spp. et les analyses statistiques des données. L'ultime volet est consacré aux propriétés biologiques des huiles essentielles de *Cinnamosma* spp. et les tests en éclosérie de crevettes.

Ce présent travail a fait l'objet de deux articles :

Razafimamonjison D. G., Danthu P., Lebrun M., Rabelohataona T., Sarter S., Ramanoelina P. (2011a) **Variability of the essential oil compositions of *Cinnamosma fragrans* and *Cinnamosma madagascariensis*, endemic plants from Madagascar.** Sous presse dans Journal of Flavour and Fragrance,.(IF: 1,266)

Razafimamonjison D. G., Danthu P., Ramanoelina P., Petit T., Sarter S. (2011b) **Antimicrobial activity of *Cinnamosma fragrans* and *Cinnamosma madagascariensis* essential oils.** Sous presse dans Food Chemistry,.(IF: 3,146)

Les résultats des tests en éclosérie de crevettes ont été présentés au congrès/forum « Les Journées scientifiques QualiREG 2011 » qui s'est tenu à St Gilles Les Hauts, La Réunion le 11-13 avril 2011 : Razafimamonjison D. G., Danthu P., Ramanoelina P., Petit T., Sarter S. **Une alternative aux antibiotiques en aquaculture de crevette : Etude de la variabilité de la composition chimique et des activités antimicrobiennes des huiles essentielles de *C. fragrans* et *C. madagascariensis*.**

**Partie I : Contexte général : Pôle
d'Excellence Régional (PER) - Généralités
sur les crevettes, sur le genre *Cinnamosma*
et ses huiles essentielles**

I Présentation du projet « Pôle d'Excellence Régional (PER) »

La thématique générale du PER consiste à la « Valorisation des ressources de la biodiversité végétale de Madagascar et des Comores pour la sécurité des aliments : identification des plantes, criblage et caractérisation des molécules actives ».

Un pôle d'excellence régional est un réseau de compétences universitaires et scientifiques, exerçant dans un cadre régional, sur une thématique commune. Celui-ci est financé par l'Agence Universitaire de la francophonie (AUF) pour une durée de 3 ans (2008-2011).

Un pôle d'excellence régional est donc constitué par un centre universitaire (laboratoire, centre de recherche, département, faculté, et d'un établissement membre de l'AUF) dont le programme est réalisé en relation avec des partenaires régionaux. Des collaborations d'universités d'autres régions, notamment du Nord, peuvent également intervenir. Les universités partenaires du Nord sont ainsi invitées à contribuer aussi à cette mutualisation scientifique de haut niveau et à son rayonnement régional.

Ce programme vise donc à :

- identifier les centres de haute valeur scientifique avérée des pays du Sud ;
- les renforcer ;
- les amener à mobiliser un réseau régional de compétences collaborant autour de mêmes thématiques, en mutualisant les moyens disponibles et, dans la mesure du possible, les contributions complémentaires d'autres partenaires.

I.1. Thématique retenue

Les microorganismes (bactéries, champignons), qu'ils soient pathogènes ou d'altération, représentent des risques majeurs pour la qualité et la sécurité des aliments. Ce projet propose de rechercher, dans les biodiversités végétales de Madagascar et des Comores, de nouvelles molécules d'intérêt biologique pour améliorer la sécurité sanitaire des denrées alimentaires.

La biodiversité malgache comporte 12000 espèces dont 80% sont endémiques. Malgré le nombre croissant d'études sur cette biodiversité végétale, nombreuses sont les espèces qui n'ont pas encore fait l'objet d'études approfondies pour la caractérisation de leur composition chimique, et de leurs propriétés antimicrobiennes ou nutritionnelles. Plusieurs

de ces plantes sont cependant décrites par la pharmacopée malgache et sont utilisées empiriquement pour soigner plusieurs pathologies infectieuses.

Le projet d'une durée de 3 ans vise à créer un pôle scientifique régional doté de moyens et de ressources pour soutenir une recherche de qualité afin d'approfondir la caractérisation de plantes d'intérêt à partir des biodiversités de Madagascar et des Comores.

I.2.Objectifs scientifiques

- Identifier des plantes d'intérêt biologique (activités antimicrobiennes, propriétés nutritionnelles).
- Caractériser la composition chimique et les propriétés biologiques des extraits végétaux de quelques plantes endémiques sélectionnées.
- Evaluer la variabilité des molécules utiles (variabilité géographique et saisonnière) afin de développer des modes de gestion durables des espèces intéressantes.

I.3. Objectifs partenariaux

La mise en place d'un réseau scientifique régional pour la recherche et la formation associant les Universités de Madagascar (Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée et Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques), des Comores et de la Réunion, ainsi que des centres de recherches (CNARP, FOFIFA, CIRAD).

Le renforcement des capacités des équipes du Sud (Comores, Madagascar) par la formation de jeunes chercheurs malgaches et comoriens et l'appui d'institutions du Nord (CIRAD, Université de la Réunion).

La mutualisation des équipements des différentes institutions travaillant sur cette thématique à Madagascar.

II Généralités sur les crevettes pénéides

Les individus élevés en aquaculture des eaux marines sont des crevettes tropicales de la famille des Pénéidés. Pour mieux situer cette espèce dans le monde du vivant, voici sa classification ou sa systématique.

II.1. Systématique

Les crevettes pénéides appartiennent à :

Embranchement : Arthropodes

Classe : Crustacés

Ensemble : Malacostracés

Sous-classe : Eucaridés

Ordre : Décapodes

Sous-ordre : Nantatia

Famille : Penaeidae

Genre : Penaeus



Figure 1 : Penaeus monodon (Motoh, 1981)

II.2. Etudes morphologiques

Comme tout arthropode, les crevettes présentent une symétrie bilatérale bien marquée. Elles sont formées de deux régions bien distinctes (Beaumont *et al.*, 1981):

Le Céphalothorax est recouvert d'une carapace d'un seul tenant. Cette partie est issue de la fusion entre la tête et le thorax, d'où le nom de Céphalothorax. Ces dernières sont séparées par un sillon cervical (Figure 1 et 2).

D'un côté, la tête comporte : une bouche, deux yeux pédonculés et cinq paires d'appendices sensoriels : les antennules, antennes, mandibules, maxillules et maxilles.

De l'autre côté, le Thorax ou Péréion dispose d'appendices appelés « péréiopodes » ou pattes thoraciques dont les trois premières paires sont munies de pinces.

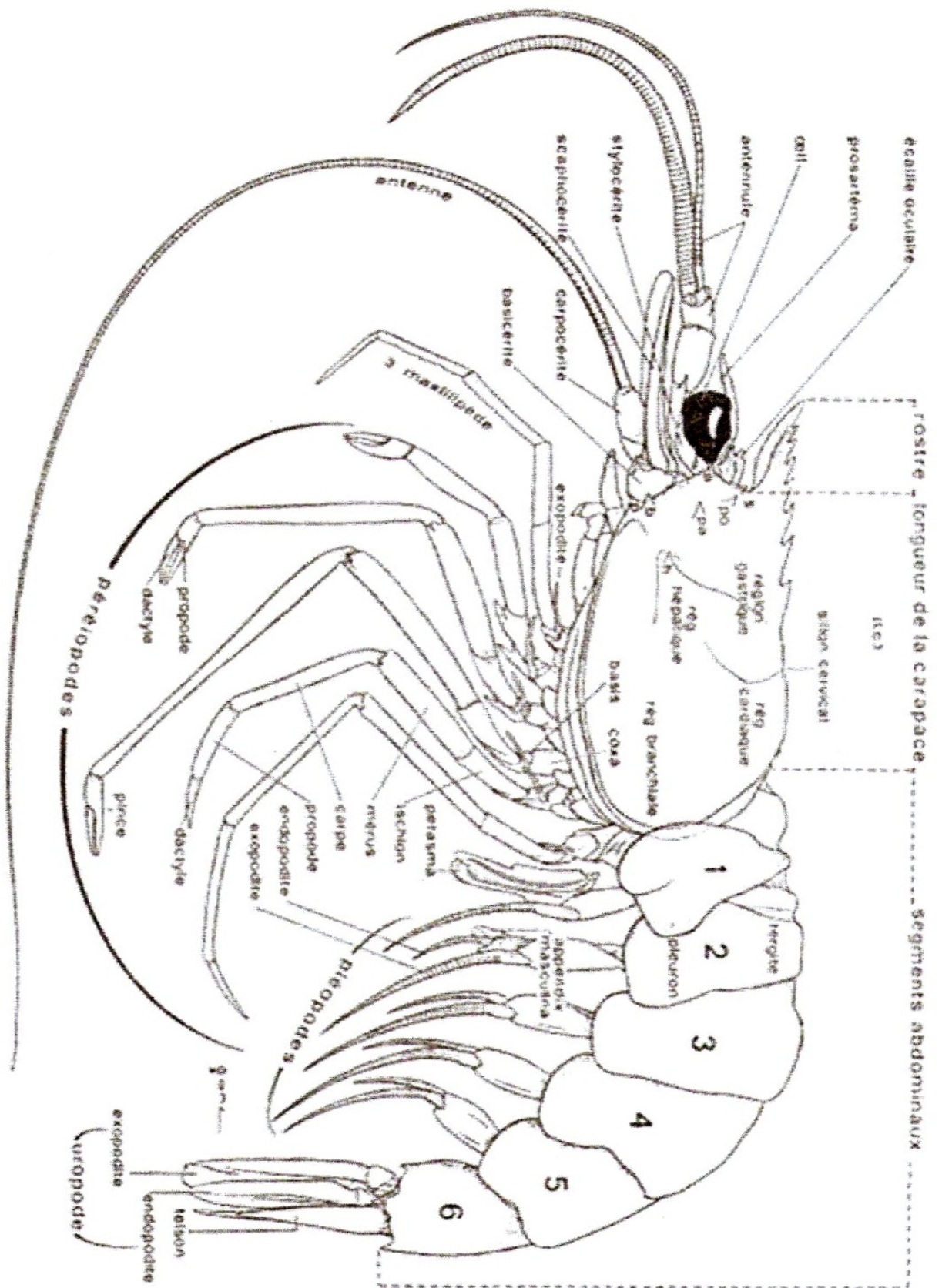


Figure 2 : Morphologie externe des Pénéides (Motoh, 1981)

L'Abdomen ou Pléon, partie segmentée, est constitué de six métamères nettement individualisés. Les segments sont articulés entre eux et mobiles dans le plan sagittal. Chaque métamère dispose d'une paire d'appendices appelés pléiopodes ou pattes abdominales. L'abdomen se termine par le Telson. Celui-ci forme avec la dernière paire de pléiopodes une puissante nageoire caudale : c'est l'Uropode.

Pour se protéger, les crevettes ont un rostre bien développé et garni d'épines dorsales et ventrales (Figure 2). *Penaeus monodon* a une formule rostrale de 7 – 8/2 – 3 (Bossier, 1980).

II.3. Sexualité

Les crevettes sont des animaux invertébrés parfaitement sexués. Le mâle et la femelle sont nettement différenciés.

A premier abord, les mâles ont une plus petite taille par rapport aux femelles. A la première maturité sexuelle, le mâle ne pèse que 40 g avec une carapace de 38,5 mm alors que la femelle atteint un poids de 70 g pour une carapace de 46 mm (Primavera, 1980).

Mais le principal critère de différenciation sexuelle réside dans la forme et la localisation des appareils sexuels. L'appareil copulateur du mâle se situe à la jonction de deux rames internes modifiées de la première paire de pattes abdominales, c'est le pétasma. Pour la femelle, un étui plus ou moins développé ventralement et appelé thélycum sert d'appareil copulateur. Celui-ci se trouve à la base de la cinquième paire de pattes thoraciques.

Le thélycum peut être ouvert ou fermé selon les espèces. *Penaeus monodon* fait partie des espèces à thélycum fermé.

II.4. Cycle de vie

Dans le milieu naturel ou dans tout élevage contrôlé, les crevettes se maintiennent et perpétuent en passant par les principales étapes biologiques suivantes :

II.4.1. Fécondation et ponte

La fécondation n'a lieu que lorsque les individus ont atteint leur pleine maturité sexuelle. Pour la femelle particulièrement, la maturation sexuelle s'observe à travers la région céphalothoracique – abdominale où l'ovaire devient turgescence et prend une couleur sombre. Juste après la mue qui suit cette maturation, l'accouplement a lieu. Les spermatozoaires émis par le mâle s'insèrent à l'intérieur du thélycum de la femelle, et ceci en plein mer. La femelle va alors pondre. Les œufs sont fécondés au moment de l'expulsion.

A une température de 24 à 28° C, 12 à 15 heures après la ponte sont nécessaires pour incuber les œufs.

Par ailleurs, les individus destinés à devenir des géniteurs sont minutieusement sélectionnés en aquaculture.

II.4.2. Développement larvaire

La température constitue l'un des principaux paramètres à maîtriser pour son bon déroulement. Effectivement, la vitesse de développement des larves atteint son optimum à une température avoisinant les 28° C. Ainsi, au bout de 12 à 18 jours, les larves ont achevé leur développement.

Sont énumérées ci-dessous les quatre phases successives du développement larvaire (Figure 3) :

a) Phase Nauplius

Une fois éclos, les œufs donnent naissance à des nauplii. Ce sont des individus ayant un corps massif, globuleux, non-segmenté et renflé. Cette phase dure environ 6 jours. Les nauplii utilisent uniquement leurs réserves vitellines pour se nourrir.

b) Phase Zoé

Les caractères morphologiques de l'adulte commencent à apparaître chez les larves Zoé. En effet, une segmentation du corps s'opère et l'ébauche du céphalothorax et celle de l'abdomen sont ainsi nettement individualisées. La première prend une forme ovale alors que la seconde a une forme allongée. Les Zoé se nourrissent de phytoplancton et de zooplancton puis rejettent un cordon fécal. Ce dernier est une traînée d'algues plus ou moins dégradées, c'est le signe d'un bon développement. Cette phase prend fin au bout de 4 à 5 jours.

c) Phase Mysis

La segmentation qui a lieu précédemment se poursuit dans cette phase. Ainsi, les larves Mysis acquièrent grossièrement toute la morphologie des crevettes adultes. De plus, l'alimentation devient de plus en plus carnée : les Mysis se nourrissent essentiellement d'*Artémia* qui est un crustacé de très petite taille. Au bout de 5 jours, cette phase est accomplie.

d) Phase de Post-larves

Les post-larves se différencient des Mysis par présence d'appendices abdominaux qui servent à la nage. Pendant la période diurne, ils sont au repos complet, mais ils sont par contre très actifs au cours des périodes nocturnes (prise de nourriture, mues, déplacements, migration...). Ils adoptent progressivement les comportements et la morphologie de l'adulte. Selon leur âge, ils sont dénommés PL15, PL18 (post-larves de 15 ou 18 jours). Cette phase marque la fin du cycle larvaire.

II.4.3. Juvéniles

C'est le nom donné aux individus compris entre les post-larves et les adultes

II.4.4. Adultes

C'est la dernière étape du développement des crevettes. Celles-ci ne subissent aucune transformation majeure. Elles muent et elles grossissent essentiellement.

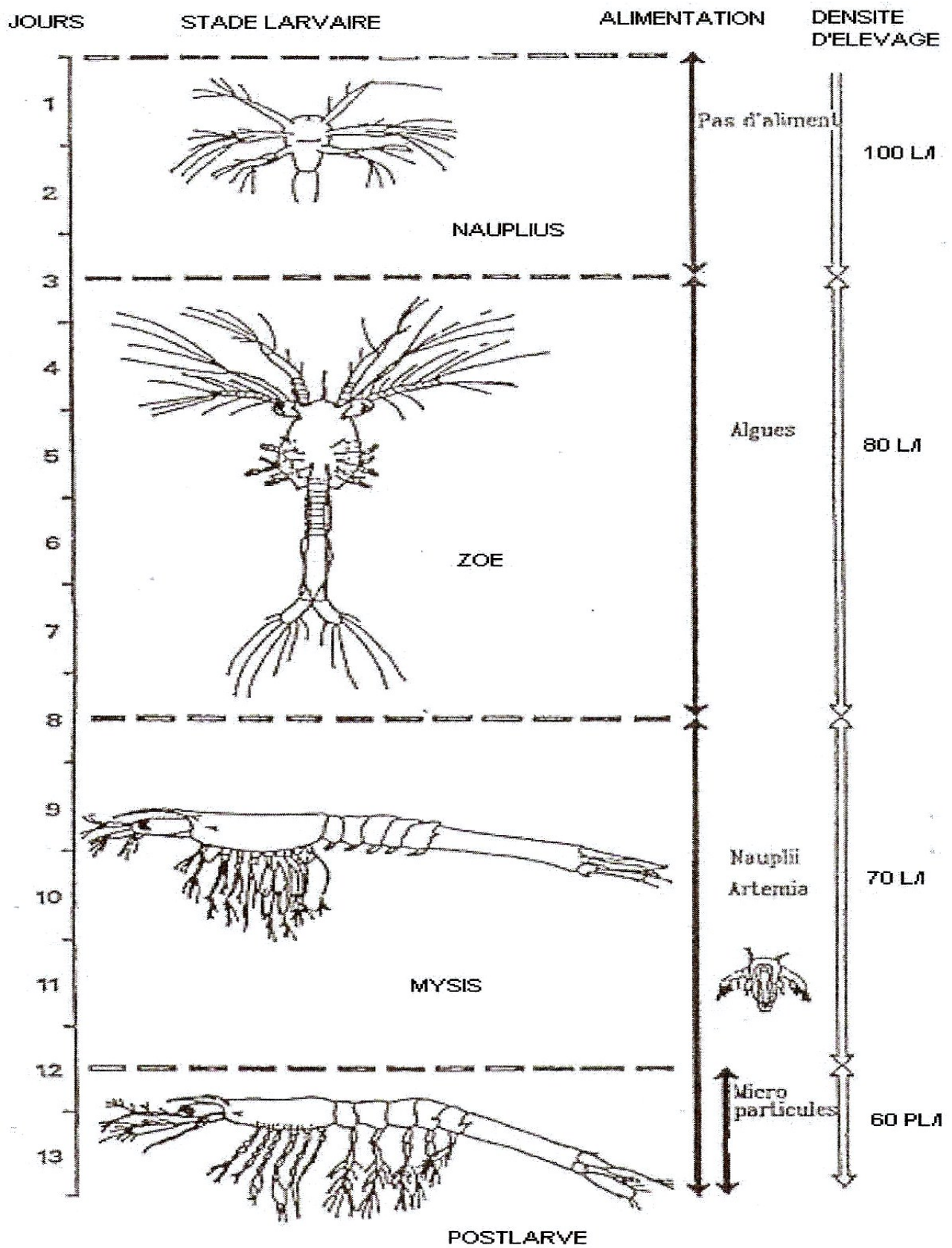


Figure 3 : Différents stades larvaires (Motoh, 1981)

II.5. Répartition bathymétrique

L'étude de la biologie des crevettes s'avère indispensable. Notamment, il faut comprendre le mode de vie et l'habitat à l'état sauvage. En aquaculture, reproduire autant que possible ce mode de vie est une condition sine-qua-non de la réussite de l'élevage.

Selon l'âge et le stade de développement, l'habitat des crevettes varie. Mais ce dernier se trouve principalement dans les fonds vaseux ou sablonneux de 0 à 25 m.

Les estuaires et les zones de mangroves, riches en ressources nutritives, sont les lieux de prédilection des larves. Ce sont une zone de nurserie.

Une fois adultes, les crevettes quittent les estuaires pour migrer vers les zones profondes en haute mer. Elles y pondent leurs œufs, et après l'éclosion, les larves reviennent aux estuaires. Et le cycle recommence. (Figure 4)

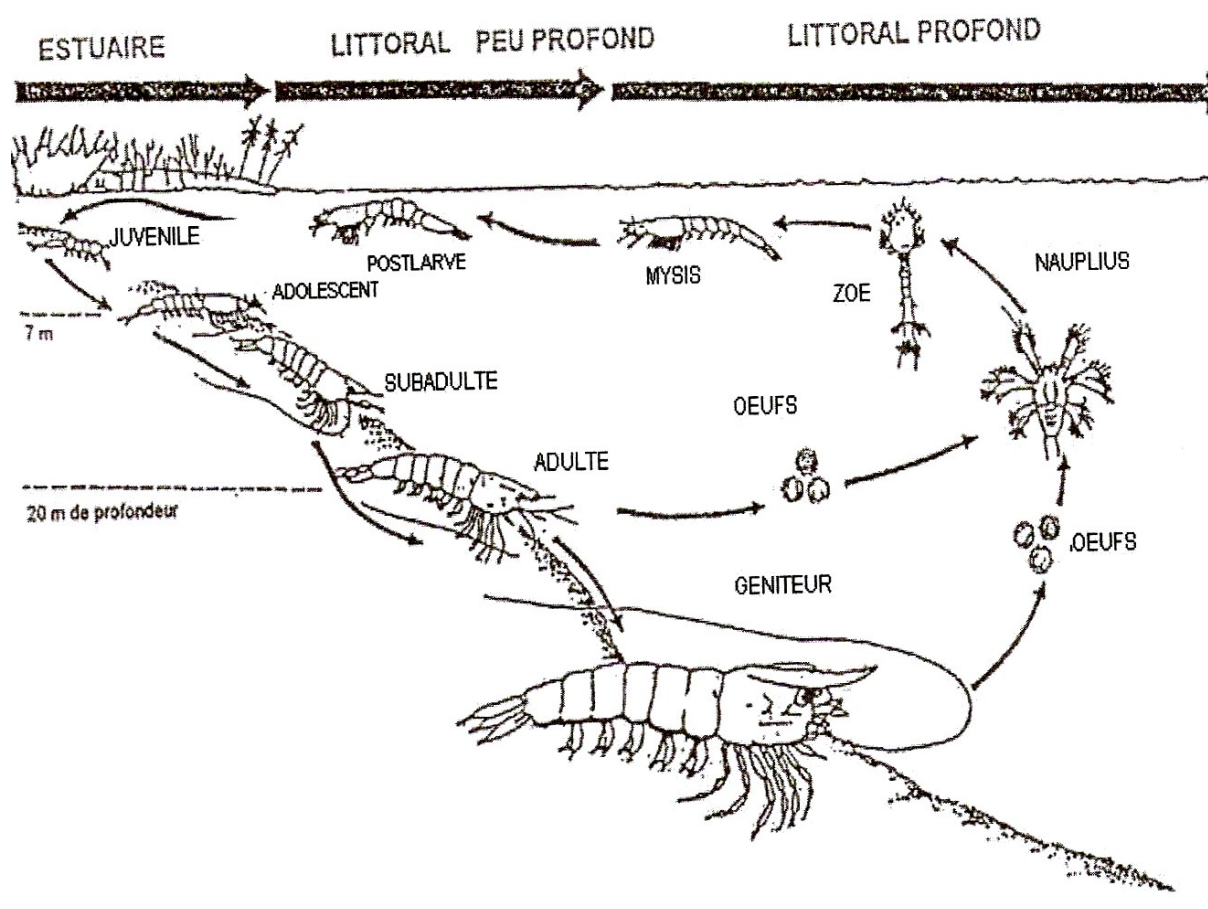


Figure 4 : Répartition haline et bathymétrie des Pénéides (Motoh, 1981)

II.6 Etapes d'élevage

II.6.1. Ecloseries

Dans le milieu naturel, des juvéniles sauvages sont sélectionnés. Ils sont ensuite élevés en milieux contrôlés et ils deviennent, une fois adultes, des géniteurs. Ceux-ci passent alors par les différents stades suivants :

a) Maturation

Il s'agit d'entretenir les géniteurs dans des bacs circulaires de façon à ce qu'ils soient physiologiquement prêts pour pondre. Ils sont alors alimentés de nourritures fraîches et de compléments spécifiques.

Maintenir la température entre 27° C et de 30° C et le pH entre 8,1 et 8,3 sont conseillés pour un meilleur déroulement de la maturation, et cela avec un taux de salinité voisin de 35 ‰ et un taux d'oxygène proche de la saturation (Razafindrazaka, 1997). Ainsi, un renouvellement d'eau à raison de 150 % par jour et une recirculation d'eau à raison de 150 à 200 % par jour sont nécessaires.

b) Ponte et éclosion

Lorsque les femelles sont matures, une ablation oculaire unilatérale est pratiquée afin de provoquer la ponte. Elles sont alors isolées et pondent la nuit. Des filtres permettent de récupérer les œufs. Ceux-ci sont ensuite disposés dans un incubateur et ils sont éclos au bout d'environ 12 heures. Les nauplii obtenus sont alors transférés en bac d'élevage.

Dans la zone de ponte, aucun renouvellement d'eau n'est effectué et un faible bullage suffit pour l'aération. Il faut absolument éviter l'infiltration de la lumière dans cette zone en la recouvrant d'un couvercle opaque. Une diminution de la dureté de l'eau pour abaisser la salinité de 35 pour mille est également recommandée.

c) Elevage larvaire

Les larves sont élevées dans des bacs cylindro-conique ou en forme de « U ». En général les larves sont nourries d'aliments frais et de complément en poudre. L'alimentation des larves varie suivant leur phase développement.

Au stade Zoé, elles sont nourries d'algues unicellulaires. Celles-ci sont produites à partir de blooms successifs dans des volumes croissants. Les algues les plus couramment employées en nurserie sont : *Monochrysis luther* (3 à 5 µm), *Tetraselmis chui* (10 à 20 µm), *T. tetrahele* (10 à 15 µm) et *Isochrysis sp.* Il est important que la culture soit pure pour chacune des espèces.

Au stade Mysis, voire à la fin du stade Zoé, des nauplii d'*Artémia* constituent la nourriture principale des larves de crevettes. L'*Artémia* est un petit crustacé qui sert de proie vivante.

Au stade de post-larves : Les post-larves consomment de microparticules et de métanauplii d'*Artémia*. L'objectif de cette phase est d'acclimater ces post-larves aux conditions de bassins de prégrossissement où il y a un risque de baisse de la salinité.

Bref, une éclosérie-nurserie est un ensemble d'unités ayant chacune des fonctions propres dont l'objectif est de produire des post-larves. Les unités doivent fonctionner de manière synchrone, ce sont (Avalle, 1994) :

- Des bassins de stockage des reproducteurs ;
- une zone de maturation ;
- une unité pondoir
- une unité éclosier ;
- une unité nurserie ;
- une salle de production d'algues unicellulaires ;
- une unité de production d'*Artémia*.

II.6.2. Prégrossissement

Les conditions d'élevage (température, taux d'oxygène dissous, pH...) à l'éclosérie-nurserie sont nettement différentes des exigences dans les bassins d'élevage. Pour diminuer donc le taux de mortalité dû au changement brusque de milieu de vie et pour faciliter la croissance, une étape intermédiaire d'acclimatation est souhaitable. C'est l'objet du prégrossissement.

Il se pratique dans des bassins de terre argileuse. Le système est très intensif car la densité varie de 80 à 200 post-larves par m². Les juvéniles se nourrissent ainsi d'aliments divers mais de dimension très fine : phytoplancton, zooplancton, granulé spécial pour post-larves. Elles y sont élevées pendant une durée moyenne de 30 à 45 jours. Le poids initial des post-larves est de 4 à 7 mg et atteint 10 à 15 g à la fin du prégrossissement.

II.6.3. Grossissement

C'est la phase ultime de l'élevage. Les crevettes sortant du prégrossissement sont engraisées dans des bassins d'élevage de façon à obtenir le poids commercial recherché. Les bassins ont un fond argileux.

Des granulés associés à la productivité naturelle du milieu (plancton) servent à nourrir les juvéniles. Le poids commercialisable de 20 à 30 g est atteint au bout de 4 à 5 mois d'élevage.

II.7. La crevetticulture à Madagascar

L'aquaculture de crevettes est une activité très récente à Madagascar. Les travaux de mise en place de la première ferme industrielle n'ont commencé qu'en 1992. L'activité a été entreprise suite aux résultats des essais de faisabilité très prometteurs, liés à la ferme pilote de Nosy Be.

En 2002, soit dix ans plus tard, 7 fermes industrielles et une ferme artisanale sont opérationnelles et une vingtaine de demandes d'installation sont enregistrées au niveau du Secrétariat d'Etat chargé de la Pêche et des Ressources Halieutiques.

Depuis des années, les produits halieutiques ont été l'une des principales sources de devises du pays. A titre d'illustration, les valeurs d'exportation réalisées de 1997 à 2001 sont les suivantes (en milliards de fmg) (Kasprzyk 2002).

- 1997 = 392,32
- 1998 = 675,21
- 1999 = 712,61
- 2000 = 850,16
- 2001 = 1060,99

En moyenne, les crevettes apportent plus de 70% des recettes totales d'exportation des produits halieutiques. Toutes les fermes opérationnelles exploitent la même espèce *Penaeus monodon*. L'espèce est présente naturellement dans la mer territoriale malgache et bien adaptée à l'environnement et aux conditions locales.

II.8. Maladies et stratégies de développements

Le développement des maladies constitue toujours un handicap pour l'industrie crevettière. Nombreuses sont les maladies dans l'aquaculture mais les plus courantes sont d'origine virale et bactérienne (*Vibrionacées*) causant une forte mortalité des crevettes (Bachère, 2000; Bachère *et al.*, 2000 ; Kautsky *et al.*, 2000 ; Yepiz-Plascencia, 2000 ; Saulnier *et al.*, 2000; Sung *et al.*, 2001a; Sung *et al.*, 2001b; Sung *et al.*, 2003 ; Flegel, 2006).

II.8.1. Maladies

a) Vibrioses

Ces infections par le *Vibrio* peuvent se développer sur la cuticule des animaux, sur les appendices et sur les branchies, en provoquant des zones nécrosées de couleur noire. Ces Vibrions surviennent généralement suite à un stress important, à des blessures ou à des carences nutritives. Le symptôme le plus visible est la mélanisation et la nécrose des appendices des larves.

Les espèces de *Vibrio* pathogènes pour les crevettes sont : *V. alginolyticus*, *V. damsela*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* et *V. penaeicida*.

b) Hépatopancréatite nécrosante

Le Hépatopancréatite nécrosante est une autre maladie bactérienne causée par les *Vibrio sp.* dont les symptômes visibles se traduisent par un exosquelette mou et sale. Cette maladie est due principalement à des mauvaises conditions d'élevage telles que la surpopulation, des températures élevées, la mauvaise qualité de l'eau favorisant la croissance microbienne.

A part les maladies d'origine bactérienne, de nombreuses maladies d'origine virale ont été aussi observées dans l'aquaculture des crevettes. Ces infections virales se propagent très rapidement et peuvent anéantir des populations entières de crevettes.

L'étude récente effectuée par Flegel (2006) a permis de recenser les principales maladies d'origine virales, entre autres :

- *Monodon baculovirus (MBV) ;*
- *Yellow-head virus (YHV) ;*
- *White-spot syndrome virus (WSSV) ;*
- *Hepatopancreatic parvovirus (HPV) ;*
- *Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) ;*
- *Taura syndrome virus (TSV) ;*
- *Mourilyan virus (MOV) ;*
- *Laem Singh virus (LSNV) ;*
- *Bacteriophage that causes shrimp mortality (VHS1) ;*
- *Miscellaneous other viruses ;*
- *Monodon slow growth syndrome (MSGs).*

II.8.2. Stratégies de développements

Actuellement, l'adoption de nouvelles techniques et de nouvelles stratégies de production permet à l'activité de progresser. Elles sont basées sur :

- la mise en place de réservoirs ou bassins de décantation et éventuellement traitement de l'eau ;
- la filtration fine pour exclure l'entrée d'hôtes porteurs dans les bassins d'élevage ;
- aucun changement d'eau pendant la durée de l'élevage ;
- le recyclage des eaux de rejets ;
- le maintien d'un floc bactérien dans les bassins grâce à une forte aération de l'eau et une mise en mouvement (conditions hétérotrophes) ;
- l'utilisation des antibiotiques contre les maladies.

L'utilisation de ces antibiotiques a permis de maîtriser les maladies infectieuses des crevettes. Les antibiotiques conventionnels utilisés en crevetticulture sont : le tétracycline, le rifampicine, le chloramphénicol, le nitrofurane, l'érythromycine, le gentamycine, le kanamycine, le sulfamerazine, le sulfisoxazole, le triméthoprim-suladiazine, le streptomycine, le furazolidone, la néomycine et le nifurpyrrol.

Néanmoins, l'utilisation mondiale d'antibiotiques dans l'aquaculture pour des buts prophylactiques et thérapeutiques a abouti à une augmentation de résistance bactérienne dans l'écosystème concerné, impactant tant animal que santé publique.

II.8.3. Résistance bactérienne aux antibiotiques

Les maladies de crevette sont parmi les plus grandes préoccupations des exploitants (Van Nguyen, 2002). La plupart des entreprises crevettières pratiquent l'élevage intensif, une grande quantité d'aliments et antibiotiques ont été utilisés pour augmenter la production et protéger les crevettes contre les maladies d'origine virale (EJF, 2003). Par conséquent, des résidus de ces antibiotiques et alimentations sont observés dans l'eau d'élevage causant la pollution de l'eau (Le *et al.*, 2003). Par ailleurs, plusieurs études ont montré que beaucoup d'antibiotiques persistent dans le bassin d'élevage pendant plusieurs mois après administration (Björklund *et al.*, 1991 ; Lunestad *et al.*, 1995 ; Pouliquen *et al.*, 1996 ; Capone *et al.* 1996 ; Weston, 1996 ; Herwig *et al.* 1997 ; Hirsch *et al.*, 1999; Miranda *et al.*, 2002). Ces résidus ont affecté sur la flore microbienne et entraîné la résistance des bactéries aux antibiotiques (Hektoen *et al.*, 1995; Tendencia *et al.*, 2002). Ces résidus ont affecté sur la flore microbienne et entraîné la résistance des bactéries aux antibiotiques (Hektoen *et al.*, 1995; Tendencia *et al.*, 2002). Plusieurs chercheurs ont annoncé aussi que beaucoup de bactéries telles que *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, résistent aux antibiotiques comme l'Acide Oxolinic, le Triméthoprime, le Sulfaméthoxazole, la Polymixine, l'Erythromycine, et la Kanamycine (Nygaard *et al.*, 1992 ; Hansen *et al.*, 1992 ; Holmström *et al.*, 2003 ; Billerbeck, 2007).

En effet, l'utilisation des antibiotiques en aquaculture dans le monde a été associée à l'émergence de résistances bactériennes. Celles-ci diminuent l'efficacité des antibiotiques et perturbent les équilibres microbiens dans les écosystèmes concernés.

II.8.4. Alternatives aux antibiotiques

Face à ce problème de résistance bactérienne aux antibiotiques, la recherche de nouvelles sources d'ingrédients, des additifs et des antibiotiques naturels dans l'aquaculture de crevette préoccupent les chercheurs. Une façon alternative pour remplacer les antibiotiques conventionnels utilisés dans l'aquaculture de crevette était l'utilisation des extraits de plantes comme agents inhibiteurs de croissance bactérienne et immunostimulants des systèmes de défense (Direkbusarakom *et al.*, 1998 ; Dorman, 2000 ; Citarasu *et al.*, 2002 ; Leano *et al.*, 2007 ; Yeh *et al.*, 2009). L'avantage principal de ces extraits consistait en ce qu'ils pourraient être utilisés dans n'importe quelle alimentation (Viuda-Martos *et al.*, 2008).

L'utilisation de l'extrait de plantes pour remplacer les agents chimiothérapeutiques dans l'aquaculture a été possible grâce à une administration par voie orale (Bioencapsulation) ou par mélange direct avec les ingrédients. Comme les extraits de plantes ne sont pas toujours acceptés directement par les crevettes, ils peuvent être nourris à l'*Artémia* qui agit alors comme un support biologique (Immanuel *et al.*, 2004).

Cinnamosma, plante endémique de Madagascar, présente des vertus curatives très vastes, et est utilisée dans la médecine traditionnelle contre les maladies de l'appareil respiratoire, les parasitoses intestinales, la maladie du foie, la syphilis (Pernet *et al.*, 1957 ; Schulte *et al.*, 1972) et la malaria (Milijaona *et al.*, 2003). Son huile essentielle présente un large spectre d'activité antibactérienne vis-à-vis des souches de bactéries gram – et surtout sur les bactéries pathogènes des crevettes telles que les *Vibrio sp.* (Randrianarivelo *et al.*, 2009). Les huiles essentielles de *Cinnamosma sp.* par leurs propriétés antibactériennes pourraient remplacer les antibiotiques chimiques conventionnels (Randrianarivelo *et al.*, 2010).

Pour mieux situer ce genre et ses huiles essentielles, les paragraphes suivants vont développer les généralités sur le genre *Cinnamosma* et ses huiles essentielles.

III Généralités sur *Cinnamosma* spp.

Le genre *Cinnamosma*, plante endémique de Madagascar, appartient à la famille des Canellacées. Ce sont des arbustes ou des arbres aromatiques constituées de neuf espèces appartenant à quatre genres tels que :

- *Winterna* d'Amérique
- *Cinnamodendron* d'Amérique
- *Warburgia* d'Amérique
- *Cinnamosma* de Madagascar

Le genre *Cinnamosma* comporte les espèces suivantes (Humbert, 1954; Perrier de la Bâthie, 1954) :

- *Cinnamosma fragrans*
- *Cinnamosma madagascariensis*
- *Cinnamosma macrocarpa*

III.1. Dénomination des espèces

III.1.1. Cinnamosma fragrans

- *Mandravasaroetra* (*Betsimisaraka, Tanala*)
- *Fanalamangidy* (*Betsileo, Tanala*)
- *Motrobeantiniaina, Motrobetiainy, Motrobeantinena* (*Sakalava*)
- *Mangidimanitra* (*Tanala*) (Pernet et al., 1957)

III.1.2. Cinnamosma madagascariensis et Cinnamosma macrocarpa

- *Mandravasaroetra*
- *Sakaihazo* (*Bezanozano*)
- *Sakaivohazo* (*Sihanaka, Tsimihety*) (Pernet et al., 1957)

Le nom « Mandravarasotra » se traduit littéralement par « qui garde les mauvaises choses au loin » ou « qui annihile le mal ».

III.2. Biosystématique

Règne : Végétal

Super-embranchement : Embryophytes

Embranchement : Tracheophytes

Sous-embranchement : Spermaphytes

Super-classe : Angiospermes

Classe : Dicotyledones

Sous-classe : Magnolidae

Super-ordre : Magnoliacées

Ordre : Magnoliales

Famille : Canellacées

Genre : *Cinnamosma* (Humbert, 1954; Perrier de la Bâthie, 1954)



Figure 5 : Pied adulte de *Cinnamosma*

III.3 Distribution du genre *Cinnamosma*

Le genre *Cinnamosma* se répartit dans l'île comme suit :

Cinnamosma fragrans est distribué dans les parties nord, nord-ouest et centrales ouest de Madagascar, dans les forêts denses sèches à une altitude en dessous de 600 m (Humbert, 1954 ; Harinantenaina *et al.*, 2006).

- Secteur Nord-Ouest : Presqu'île du Cap d'Ambre, près de la baie de Diégo Suarez ;
- Secteur Ambongo-Boina : Masiakampy, bassin moyen du Bemarivo (Boina), Firingalava, entre Maevatanana et Andriba ;
- Secteur Menabe : Aux environs de Besalampy, bassin de Maingoza, Folakary et bassin du Manambolo.

Cinnamosma madagascariensis est localisé dans l'est, sud-est et dans la partie du sud de Madagascar, dans la forêt dense humide sempervirente d'altitude notamment le versant Est continental de 900 et 1500 m d'altitude. Cependant, on rencontre une autre variété appelée *Cinnamosma madagascariensis namorensis*, dans la forêt littorale à basse altitude de 0 à 50 m (Humbert, 1954 ; Harinantenaina *et al.*, 2008).

III.4. Description botanique des espèces étudiées

La description morphologique des espèces étudiées est résumée dans le tableau 1.

Tableau 1 : Description morphologique des espèces étudiées (Humbert, 1954)

Espèces	<i>Cinnamosma fragrans</i>	<i>Cinnamosma madagascariensis</i>
Morphologie générale	Arbre ou buisson arbustif très aromatique, endémique de Madagascar, dont les écorces, les feuilles et les fruits présentent une saveur pimentée brûlante.	Arbre de 6 à 20 m de haut et rarement arbustif, très aromatique, aux feuilles de saveur brûlante.
Feuilles	Feuilles ponctuées, translucides, opaques, coriaces et de couleur verte sombre au stade adulte. Pétiole court, d'une longueur de 3 à 8 mm. Limbe oblong-lancéolé-linéaire, de grandeur très variable, souvent sur un même rameau. Nervures latérales peu nombreuses, distantes.	Feuilles adultes coriaces, vertes sur les deux faces, courtement pétiolées, ovales-lancéolées, rarement oblongues, peu atténuées vers la base, où le limbe est courtement décurrent sur le pétiole. Les nervures latérales sont visibles.

Suite tableau 1

Appareil reproducteur	<p>Les feuilles sont sessiles ou subsessiles, axillaires, presque toujours solitaires, rarement géminées, petites (5 à 6 mm), ponctuées-glanduleuses, accompagnées à la base de 3 à 7 bractées densément imbriquées en spirale.</p> <p>Sépale large, inégaux, au nombre de 3, plus courts que la corolle, caducs.</p> <p>Corolle tubuleuse à tube plus long que les lobes, au nombre de 4 à 6. Ces lobes sont larges, arrondis au sommet, réfléchis à l'anthère.</p> <p>Tube de l'androcée plus long que celui de la corolle, nu sur 1,5 mm à la base prolongé au dessus des anthères par un court manchon, membraneux. Les anthères sont linéaires, au nombre de 7 à 10.</p> <p>Le pistil est contracté à la base, atténué en style épais et court (4 mm), creux, arrondi au sommet.</p> <p>Les placentas sont au nombre de 4 à 5 et sont multiovulés.</p>	<p>Les fleurs sont solitaires, fasciculées par 3 à 5 sur les parties défeuillées des rameaux.</p> <p>Les bractées sont au nombre de 5 à 7, les plus inférieurs sont écailleuses, petites, souvent bifides ou déchirées et noirâtres au sommet.</p> <p>Le calice a des sépales larges et épais, le plus grand à 2,5 mm de long.</p> <p>La corolle a un tube plus long que large. Les lobes sont au nombre de 4 à 5, arrondis au sommet.</p> <p>L'androcée a 7 à 10 anthères, le pistil à 4 mm de haut, est contracté à la base, le style est épais et court.</p>
Les fruits et graines	<p>Les fruits sont de couleur verte.</p> <p>L'épicarpe de fruit est lisse et mince. Le mésocarpe est charnu et assez épais.</p> <p>Le fruit a une forme et grandeur variable, muni au sommet d'une apicule court-obtus, de longueur de 4 à 6 mm, pédicellé.</p> <p>Le fruit est ovoïde (4 * 3 cm), obovale (6 à 6,7 * 3 à 4,5 cm) ou irrégulièrement allongée (7 à 8 * 3 à 3,5 cm).</p> <p>Un fruit comporte 15 à 25 graines, de couleur fauve clair, fortement ridées-ruminées, irrégulièrement subréniformes courbées et comprimées (17 * 11 mm).</p>	<p>Le fruit solitaire est inséré sur l'axe des rameaux. Il est apiculé et d'une forme globuleuse, sa longueur varie de 14 à 20 mm et sa largeur de 15 à 22 mm. Le péricarpe est charnu.</p> <p>Les graines sont peu nombreuses au nombre de 5 à 10 par fruit, elles sont peu comprimées et subréniformes, d'un roux clair, entourées d'un mucilage plus ou moins abondant, clair puis brun rougeâtre à maturité.</p>



Figure 6 : Rameau fructifère du *Cinnamosma* (Perrier de la Bâthie, 1954)

III.5. Propagation végétative de l'espèce

L'exploitation de cette espèce pour la production d'huiles essentielles se fait en général par abattage des arbres. Cette espèce est alors menacée de surexploitation et risque de connaître le même sort que le « Kotoky » ou *Prunus africana* (exploitation sauvage) si aucune mesure n'est pas prise. Actuellement le genre *Cinnamosma* ne bénéficie officiellement d'aucun statut de protection. Ce genre n'est mentionné ni dans la convention CITES, ni dans la liste rouge de l'IUCN.

Heureusement, le genre *Cinnamosma* peut se reproduire par recépage, par régénération naturelle ou par régénération artificielle.

III.5.1. Recépage

Le genre *Cinnamosma* est une espèce qui a grande capacité d'émettre de rejets de souche (Figure 7).



Figure 7 : Rejets de souche de Cinnamosma

III.5.2. Régénération naturelle

La régénération du genre *Cinnamosma* se fait naturellement par graines sans intervention sylvicole. En effet, on rencontre souvent des plantules aux alentours d'une plante mère. La multiplication naturelle se subdivise en deux selon l'espèce :

La dissémination de *Cinnamosma fragrans* se traduit par la chute des fruits. Donc elle est barochore. Elle fleurit et/ou fructifie régulièrement pendant la saison sèche.

L'espèce *Cinnamosma madagascariensis* est zoochore car ces fruits sont mangés et avalés par les lémuriens. Mais elle est aussi barochore puisque ses fruits sont soumis à l'action de la pesanteur et tombent provoquant ainsi la germination.

A part les régénérations naturelles issues des graines, le genre *Cinnamosma* émet également des régénérations sous forme de drageons. Ces dernières sont fréquentes dans le type de forêt « brûlée ». En effet, les arbres touchés par les feux ne sont plus capables d'émettre des rejets. Par contre, le développement des drageons autour de ces pieds brûlés est remarquable (plus de 5 tiges par pied) (Humbert, 1954).

III.5.3. Régénération artificielle

Le semis est le seul mode de multiplication artificielle du genre *Cinnamosma* (Figure 8). Quand les fruits se trouvent en pleine maturité, ils sont collectés et séparés de leurs graines. Ces dernières sont ensuite séchées avant de procéder à l'opération de semis (Humbert, 1954).



Figure 8 : Régénération du *Cinnamosma* par graine

III.6. Indications thérapeutiques

Le genre *Cinnamosma* possède une large gamme d'utilisations thérapeutiques.

Elle est utilisée contre :

- les maladies de l'appareil respiratoire ;
- les parasitoses intestinales ;
- les maladies du foie ;
- les maladies de l'appareil urinaire ;
- les maladies vénériennes ;
- les maladies nerveuses et organes de sens ;
- la plante toute entière possède des valeurs curatives : elle a des propriétés diurétiques et bilieuses ;
- la malaria.

Les feuilles et les tiges sont utilisées pour guérir les maux de tête et le rhume soit en infusion, soit en décoction.

La partie aérienne est à prescrire pour les états fébriles soit en infusion, en décoction, soit en tisanes composées.

L'écorce qui est aromatique, âcre, tonique, stimulante est utilisée contre le tænia et la syphilis (Pernet *et al.*, 1957 ; Schulte *et al.*, 1972 ; Milijaona *et al.*, 2003).

IV Généralités sur les huiles essentielles

IV.1. Historique

Depuis l'aube des temps, les plantes aromatiques tiennent une grande place dans la vie humaine. L'homme devait recourir aux bienfaits des plantes pour apaiser ses maux et souffrances.

Un lien incontournable s'établit entre les plantes aromatiques et l'humanité. Beaucoup d'autres faits attestent l'utilisation des plantes aromatiques et l'attention toujours grande que l'humanité leur accorde pour leurs vertus et propriétés.

On raconte que 40 000 ans avant J.C., les plantes aromatiques étaient déjà utilisées pour lutter contre les infections par les aborigènes australiens.

Dans la genèse de l'Ancien testament, le baume provenant de *Galaad* est réputé pour soigner les plaies. Dans le nouveau testament, on raconte l'histoire des Rois Mages qui en venant vénérer l'Enfant Jésus apportaient de précieuses substances aromatiques (encens et myrrhe) pour offrandes.

En Chine et en Inde, les vertus thérapeutiques des essences aromatiques sont connues depuis longtemps. La découverte au Pakistan d'un alambic en terre cuite, daté environ 5000 ans avant notre ère, en témoigne.

En chine, berceau de la phytothérapie et de l'acupuncture, l'empereur Cheng-Nong consignait dans un livre, 2800 ans avant J.C., une liste de 100 plantes utilisées à des fins médicinales. Cet ouvrage restera d'actualité jusqu'au XVI^{ème} siècle où il a été revu et corrigé par Li Che Tchen. Ce dernier a recensé dès lors plus de 1000 plantes médicinales.

Les Grecs utilisaient également des huiles aromatiques auxquelles ils attribuaient des propriétés médicinales. La mythologie grecque laisse d'ailleurs son empreinte dans le nom des plantes fameuses, signe de leur utilisation : l'Achillée mille feuilles qui sert à cicatriser les plaies d'Achille.

Les Égyptiens (env. 1500 ans avant notre ère) utilisaient des substances naturelles en médecine, en cosmétique mais également dans de nombreux rituels sacrés : l'embaumement ou momification.

En Europe, vers les XI et XIII^{ème} siècles et à l'occasion des diverses croisades, on vit affluer les épices, des herbes et des senteurs exotiques. On se mit à cultiver des herbes dans les monastères, voire à préparer des remèdes très appréciés comme l'eau de mélisse de Carmes.

Au Moyen Age, les philosophes (souvent médecins) perfectionnent des techniques permettant d'extraire « les quintessences volatiles » des substances aromatiques. Le bassin méditerranéen devenait ainsi le berceau des huiles essentielles.

Vers l'an 1000, Avicenne inventait le serpentín de l'alambic (Roulier, 1990).

C'est au XVI^{ème} siècle que naît à Grasse l'industrie des parfums. Au XVII^{ème} siècle, presque toutes les plantes d'Europe et du Proche-Orient sont distillées.

Au XVIII^{ème} siècle, apparaissent les premiers contrôles permettant de démasquer les falsifications (Salle, 1991) et dans la seconde moitié du XIX^{ème} siècle, les premiers analyses chimiques et la production des huiles synthétiques.

Depuis le début du XX^{ème} siècle, l'intérêt pour les huiles essentielles s'est encore accru. On connaît actuellement plusieurs centaines de monoterpénoides, et près de milles composés répartis selon 200 squelettes chimiques (Paris *et al.*, 1976 ; Guenther, 1984 ; Teisserie, 1991).

Concernant Madagascar, Gattefossé est le premier à publier en 1921 un article sur l'inventaire des plantes aromatiques de Madagascar qui, deux années plus tard, a été complété par Perrier de la Bathie avec la publication en 1923 d'une liste de plantes aromatiques de Madagascar. Une compilation des plantes aromatiques de Madagascar a été faite récemment par Rakotovao en 1996.

Madagascar possède des écosystèmes particuliers parmi les plus riches du monde avec un taux d'endémicité exceptionnel de près de 80 %. En ce qui concerne les huiles essentielles, le pays recèle de véritables sources de matières premières. Actuellement, environ 71 espèces aromatiques sont exploitées, dont 30 sont endémiques (Théron *et al.*, 1994). La production d'huile essentielle dans la grande île est actuellement en plein essor.

IV.2. Définition

Dans la 8^{ème} édition de la pharmacopée française, les huiles essentielles sont des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation.

Pour Bruneton (1987), les huiles essentielles sont des produits dont la composition est particulièrement complexe. Elles sont pour la plupart, extraites des plantes ou de parties de plantes par divers procédés, notamment par entraînement à la vapeur. Elles dégagent une odeur plus ou moins forte qui la caractérise. Elles sont volatiles mais liquide pour la plupart à la température ambiante.

Selon la norme AFNOR (2000), l'huile essentielle est définie comme un produit obtenu à partir d'une matière végétale, soit par l'entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe de citrus, soit par des procédés physiques ; elle peut subir des traitements physiques n'entraînant pas de changement significatif de sa composition.

Ces définitions par procédé d'obtention sont restrictives, elles excluent les produits obtenus par tout autre procédé d'extraction (solvants organiques, fluides à l'état supercritique, corps gras...).

IV.3. Localisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont presque exclusives du sous-embranchement des spermaphytes.

Les genres qui sont capables d'élaborer ces principes volatils sont regroupés dans un assez nombre restreint famille des *Angiospermes* appartenant aux ordres des *Magnoliales*, des *Laurales*, des *Rutales*, des *Lamiales* et des *Asterales* (Bruneton, 1987).

Les huiles essentielles proviennent des cellules végétales où elles sont élaborées :

- soit dans les cellules sécrétrices des *Lauracées* ou des *Zingibéracées* ou à l'extrémité des poils (Svoboda, 2000; Svoboda, 2003) ;
- soit dans les poches sécrétrices des *Myrtacées* ou des *Rutacées* ;
- soit dans les canaux sécréteurs des *Apiacées* ou des *Astéracées*.

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : fleurs (rose, tubéreuse), feuilles (citronnelle, eucalyptus, laurier), écorces (cannelier), racines (vétiver), rhizomes (curcuma), fruits (anis) et graines (muscade) (Volak *et al.*, 1994). Mais il peut y avoir quelques différences spécifiques des essences selon les parties distillées même avec une seule plante. L'essence de lavande, par exemple, est obtenue à partir d'une fleur, l'essence de patchouli est issue d'une feuille et l'essence d'orange provient d'un fruit (Microsoft, 2003).

IV.4. Rôles des huiles essentielles dans les plantes

Les essences se forment dans les parties vertes de la plantes (constituées de chlorophylles) et sont transportées, lors de la croissance de celle-ci, dans d'autres parties, en particulier dans les pousses donnant des fleurs. Le rôle des huiles essentielles dans les plantes n'est pas encore défini si bien que différentes suppositions sont avancées.

D'après Lutz (1940), les constituants des huiles essentielles sont considérés comme des modérateurs des réactions d'oxydation intramoléculaire protégeant les plantes contre les agents atmosphériques, et certains de ces composés se comporteraient comme une source d'énergie à la suite d'une baisse de l'assimilation chlorophyllienne.

Selon Bousquet (1972), certains de ces produits seraient des composés intermédiaires du métabolisme et ils se trouveraient à l'état libre durant certaines périodes en relation avec l'activité végétative de la plante.

Beaucoup de monoterpènes volatiles jouent un rôle important et varié dans la relation des plantes avec leur environnement en tant que composés allélopathiques. Ils inhibent la croissance végétale comme l' α - et le β -pinène ainsi que le 1,8-cinéole. Le 1,4-cinéole inhibe la croissance des racines de certaines herbes (Rice, 1984).

Bruneton (1987) estime que la volatilité et l'odeur marquée de ces essences en font des éléments de la communication chimique.

Les travaux de Croteau en 1986 ont montré que huiles volatiles auraient en fait un rôle mobilisateur d'énergie lumineuse et de régulateur thermique au profit de la plante. Elles réguleraient la transpiration diurne en absorbant les rayons ultraviolets par leurs constituants insaturés.

Les métabolites secondaires joueraient également un rôle écologique important. L'attrait ou la répulsion des insectes pour les plantes à fleurs en vue de la pollinisation est ainsi attribué aux constituants volatils que ces plantes contiennent.

IV.5. Caractéristiques générales des huiles essentielles

Les huiles essentielles renferment les principes responsables de l'arôme caractéristiques de chaque plante. Ces huiles sont généralement liquide, faiblement colorées, de densité inférieure à celle de l'eau, à l'exception de quelques essences (Girofle, Cannelle).

Ces substances sont solubles dans les alcools et les solvants organiques. Elles se différencient des autres huiles par leur volatilité, par leurs propriétés organoleptiques (aspect, couleur, saveur, odeur), leurs propriétés physiques (densité, indice de réfraction, pouvoir rotatoire), ainsi que leurs propriétés chimiques (composition chimique, indices d'acides, etc...) (AFNOR, 2001).

IV.6. Facteurs de variabilité des huiles essentielles

La composition chimique des huiles essentielles extraites d'une même espèce est très fluctuante. Un grand nombre de facteurs sont mis en jeu entre autres, la variété botanique, l'origine de la plante, le matériel végétatif, les conditions de la collecte, le climat, l'exposition, la saison et le processus de distillation.

IV.6.1. Variété botanique

La composition d'une huile essentielle varie en fonction de la variété. Ainsi, une dénomination de toutes les espèces botaniques permet d'identifier chaque type de plante. Andrianoelisoa *et al.* (2006) ont pu relever les ambiguïtés entre le « Ravensara » et le « Ravintsara ». Le Ravintsara (*Cinnamomum camphora*) est caractérisée par la forte teneur en 1,8 cinéole alors que dans les huiles essentielles de *Ravensara aromatica*, ce constituant n'est présenté qu'à faible teneur voire absent.

IV.6.2. Matériel végétal

Les huiles essentielles peuvent être produites par diverses parties de la plante. La composition chimique de l'huile varie donc en fonction de la partie distillée. La composition chimique des huiles extraites à partir des fleurs de *Lantana camara* se diffère que celle extraite à partir des feuilles (Randrianalijaona, 2003). D'après Andrianoelisoa (2008) les huiles essentielles de feuilles de *Ravensara aromatica* sont caractérisées par la forte teneur en sabinène alors que celles de l'écorce sont riches en méthyl chavicol. L'état du végétal peut aussi influencer non seulement le rendement mais aussi la composition chimique de l'huile. L'huile de feuilles fraîches du *Cinnamomum verum* est dominée par l'eugénol, tandis que celle des feuilles séchées contient à la fois de l'eugénol et du benzoate du benzyle comme composés majoritaires (Rasoanaivo *et al.*, 1998).

IV.6.3. Processus de distillation

Le processus de distillation joue un rôle important dans la maîtrise de la qualité d'une huile essentielle. Un produit obtenu par hydrodistillation ne sera pas identique à celui qui provient d'une extraction par des solvants organiques. La comparaison des constituants majoritaires des huiles essentielles et concrètes extraites des fleurs de *Murraya paniculata* (Linn.) a montré une grande variabilité. Les huiles essentielles se démarquent par la richesse en nérolidol (25,7 %), tandis que le manol (25,2 %) est le composant majoritaire des concrètes (Rout *et al.*, 2007).

IV.6.4. Origine et existence de variété chimiques ou chémotype

Au sein d'une même espèce, la composition chimique d'une huile essentielle peut présenter une grande diversité ; et on emploie parfois le terme « variétés chimiques ou chémotypes » (Bruneton, 1999). Ce polymorphisme chimique est bien illustré par l'exemple de *Ravensara aromatica* Sonnerat. Cette espèce présente quatre chémotypes bien distincts : le chémotype méthyl chavicol (91,10 % à 96,3 %), le chémotype méthyl eugénol (71,4 % à 83,4 %), le chémotype α -terpinène (21,10 % à 26,30 %) et le chémotype sabinène (22,7 % à 31,9 %) (Andrianoelisoa, 2008; Andrianoelisoa *et al.*, 2006).

IV.6.5. Génétique

D'après les travaux effectués par Keskitalo *et al.* (1999) sur les génotypes du « Tansy » (*Tanacetum vulgare*), la corrélation entre la matrice de distance génétique et celle de la distance chimique est hautement significative. Dans 13 génotypes, la teneur en camphre est supérieure à 18,5 %, elle est moins élevée dans les autres (7,2 %).

IV.7. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles présentent une composition chimique très complexe, avec parfois plus d'une centaine de constituants.

Parmi ces constituants, deux types de composés constituent la presque majorité d'une huile essentielle : les terpènes et les produits oxygénés.

Les terpènes constituent un groupe de molécules très différentes tant du point de vue structural que fonctionnel. Ils ont pourtant un caractère commun du fait qu'ils sont tous formés d'unités isopréniques (unité en C_5 ramifiées). Selon le nombre d'unités isopréniques constitutives, on distingue les hémiterpènes (C_5), les monoterpènes (C_{10}), les sesquiterpènes (C_{15}), les diterpènes (C_{20}), les sesterpènes (C_{25}), les triterpènes (C_{30}), les caroténoïdes (C_{40}) et les polyisoprènes (C_n).

Les produits oxygénés regroupent les monoterpénols $C_{10}H_{18}O$ de masse moléculaire égale à 154, les sesquiterpénols $C_{15}H_{26}O$ de masse moléculaire 222, les oxydes de sesquiterpènes, les alcools, les aldéhydes, les cétones, les époxydes, les esters, etc.

IV.8. Utilisation des huiles essentielles

L'emploi des huiles essentielles est déjà connu depuis l'Antiquité. Actuellement, elles sont utilisées dans divers domaines industriels parmi lesquels la parfumerie et la cosmétique, les industries pharmaceutiques, l'agroalimentaire, les industries chimiques ainsi que l'aquaculture de crevettes.

IV.8.1. Parfumerie et cosmétique

Les industries de parfumerie et de cosmétique utilisent des huiles essentielles naturelles ou synthétiques dans la formulation de leur produit. En tant que matière première, ces industries consomment plusieurs quantités d'essences venant directement des pays producteurs, c'est qui est d'ailleurs le débouché principal des huiles essentielles. Lors de la 7^{ème} édition du *World Perfumery Congress* (WPC 2007) sur la parfumerie à Grasse, des nouveaux ingrédients naturels haut de gamme, à caractère original sont présentés par une trentaine d'exposant, entre autres les produits Purecoeur de Clos d'Aguzon avec l'Encens Résinoïde, Patchouli essence qui ont connu un fort succès.

Pour le cas de Madagascar, les huiles essentielles produites localement et extraites de diverses plantes telles que *l'Ylang-Ylang*, le *Basilic*, le *Palma Rosa* entrent aussi dans la composition de certains parfums de luxe haut de gamme.

IV.8.2. Industries agro-alimentaires

En alimentation, les extraits aromatiques jouent essentiellement le rôle de condiment (poivre, gingembre), d'exhausteur de goût (agrumes), d'aromatisant (menthe, thym) ou d'antioxydant et de conservateur. Les extraits aromatiques sont aussi utilisés dans les boissons, dans la confiserie, les produits laitiers carnés, les soupes, sauces, la boulangerie, snack (Ribnicky *et al.*, 2004), la nutrition animale sans oublier l'aromatisation de la viande (Ahmed *et al.*, 2000).

IV.8.3. Industries chimiques

Les huiles essentielles de certaines plantes se sont montrées actives contre les insectes ravageurs en présentant un effet répulsif. Par exemple, la formulation utilisée sur la vigne en biodynamie ayant pour but de protéger des maladies et des insectes emploie un mélange de l'huile essentielle de clou de girofle avec d'autres constituants (Lemelse, 2004). De nombreuses études ont été menées pour l'utilisation des huiles essentielles dans d'autres domaines comme l'agriculture, notamment comme insecticides ou fongicides (Zani *et al.*, 1991 ; Chiasson *et al.*, 2007).

IV.8.4. Propriétés antimicrobiennes

Plusieurs travaux ont montré que les huiles essentielles possèdent un large spectre d'activité antimicrobienne. Le pouvoir antimicrobien élevé des huiles essentielles est attribué à leur richesse en produits oxygénés monoterpéniques comme le linalol et le 1,8 cinéole. Ces produits sont aptes à désintégrer la membrane cellulaire des bactéries (Bekhechi *et al.*, 2008; Pavithra *et al.*, 2009).

Une étude récente menée par Neng-guo *et al.* (2009) a montré que les huiles essentielles de *Citrus sinensis* Osbeck, caractérisées par la forte teneur en limonène (77,49 %), possèdent des spectres d'activités antimicrobiennes vis-à-vis des *Staphylococcus aureus*, *Penicillium chrysogenum*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Saccharomyces cerevisiae*. Les concentrations minimales inhibitrices ont été évaluées entre 4,66 µl/ml et 18,75 µl/ml.

V Synthèse des travaux effectués sur les huiles essentielles de *Cinnamosma* spp.

V.1. Rendement et propriétés physico-chimiques

Le tableau 2 montre les rendements et les caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de *Cinnamosma* sp. (Schulte *et al.*, 1972 ; Rasendra, 1994 ; Ranaivoarisoa, 2000 ; Ravoninahitra-Ravalison, 2005 ; Razanamparany, 2005 ; Tomboarisendra, 2005 ; Ranaivosoa, 2006 ; Arnal-Schnebelen *et al.*, 2007).

Tableau 2 : Rendements et les caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de *Cinnamosma* sp

Auteurs	Rendement %	Densité	Indice de réfraction	Pouvoir rotatoire	Indice d'acide	Indice d'ester
Schulte <i>et al.</i> (1972)	0,8	-	1,1942	- 6°	-	-
Rasendra <i>et al.</i> (1994)	0,48 à 0,52	0,7859 à 0,9190	1,4777 à 1,4896		2	4,9
Ranaivoarisoa <i>et al.</i> (1996)	0,83 à 1,18	0,8888 à 0,9209	1,4811 à 1,4815	+ 3°10	1,4	4,2
Razanamparany (2005)	1,52 à 2,30	-	1,4691 à 1,4742	-	-	-
Ravoninahitra (2005)	1, 89 à 3,02	0,9002 à 0,9009	1,4655 à 1,4756	+ 6°10	-	-
Tomboarisendra (2005)	0,24 à 0,40	-	1,4869 à 1,4892	-	-	-
Ranaivosoa (2006)	1,82 à 3,40	0,8924 à 0,9050	1,4645 à 1,4685	-	-	-
Arnal <i>et al.</i> (2007)	-	0,9452	1,4636	-	-	-

D'après ce tableau, le rendement obtenu diffère d'un auteur à un autre. En effet, le rendement en huile essentielle de Ranaivosoa (2006) est élevé (3,40 %) par rapport à celui de Schulte *et al.* (1972) (0,8 %).

L'huile essentielle de *Cinnamosma* sp. est plus légère que l'eau. Sa densité relative oscille entre 0,8888 à 0,9209.

Si les huiles essentielles de Ravoninahitra-Ravalison (2005) se caractérisent par un pouvoir rotatoire positif (+6°10), ceux de Schulte *et al.* (1972) se démarquent par sa déviation polarimétrique négative (- 6°).

V.2. Composition chimique de l'huile essentielle de *Cinnamosma fragrans*

Le tableau 3 résume la composition chimique des huiles essentielles de *C. fragrans* (Randrianarivelo *et al.*, 2009)

Tableau 3 : Composition chimique des huiles essentielles de *C. fragrans* (% relatif) (Randrianarivelo *et al.*, 2009)

		Tsaramandroso Moy ^a	Mariarano Moy ^b
α-Pinène	1012	1,0 ± 1,3	3,5 ± 1,5
Camphène	1056	1,1 ± 1,6	1 4,8 ± 2,2
β-Pinène	1097	0,9 ± 1,0	8,0 ± 3,8
Sabinène	1113	0,9 ± 1,0	1,8 ± 0,9
δ-3-Carene	1142	0,5 ± 0,7	1,7 ± 1,1
α-Phellandrène	1157	0,2 ± 0,2	0,4 ± 0,7
Myrcène	1160	0,2 ± 0,4	0,6 ± 1,0
Pseudolimonène	1167	0,3 ± 0,4	0,7 ± 1,3
α-Terpinène	1174	1,4 ± 3,7	0,9 ± 1,5
Limonène	1191	0,7 ± 2,3	1,3 ± 1,9
β-Phellandrène	1201	0,4 ± 0,6	0,4 ± 0,9
(Z)-β-Ocimène	1232	0,7 ± 0,8	1,1 ± 1,3
(E)-β-Ocimène	1248	0,2 ± 0,3	0,3 ± 0,3
p-Cymène	1263	0,4 ± 1,1	0,8 ± 1,1
Terpinolène	1278	0,8 ± 1,4	0,6 ± 0,8
allo-Ocimène	1284	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,3
1,8-Cinéole	1207	0,5 ± 0,9	47,3 ± 10,2
Perillène	1294	tr	0,1 ± 0,2
Oxyde de cis-linalol (furanoïd)	1439	0,7 ± 0,9	0,5 ± 0,9
Oxyde de trans-linalol (furanoïd)	1468	1,2 ± 2,7	0,0 ± 0,1
Citronellal	1472	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,4
Linalol	1549	72,5 ± 23,3	1,1 ± 1,5
Camphre	1505	0,2 ± 0,7	0,2 ± 0,2
Acétate de Bornyle	1575	0,2 ± 0,4	0,7 ± 0,8
Myrténal	1600	0,2 ± 0,4	0,1 ± 0,2
Terpinène-4-ol	1606	1,5 ± 2,3	2,2 ± 2,0
(E)-2,6 Diméthyl-3,7-octadiène-2,6-diol	1669	0,3 ± 0,6	0,5 ± 1,3
Acétate de α-terpinyle	1687	0,1 ± 0,2	0,3 ± 0,5
(Z)-2,6 Diméthyl-3,7-octadiène-2,6-diol	1696	0,0 ± 0,1	0,1 ± 0,2
1-Terpinéol	1700	1,2 ± 1,4	4,2 ± 3,0
Acétate d'éryle	1720	0,0 ± 0,1	0,2 ± 0,5
Géranial	1735	0,0 ± 0,1	0,2 ± 0,2
Citronellol	1751	0,0 ± 0,1	0,1 ± 0,2
Nérol	1795	0,8 ± 1,8	0,5 ± 0,9
Isogéranol	1811	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,1

Suite tableau 3

Géraniol	1845	0,8 ± 1,5	1,2 ± 2,1
α-Cubébène	1455	0,1 ± 0,2	0,2 ± 0,4
α-Copaène	1480	0,4 ± 1,2	1,4 ± 1,8
β-Cubébène	1535	0,9 ± 1,9	0,5 ± 1,0
β-Caryophyllène	1654	0,7 ± 1,3	1,1 ± 1,8
α-Humulène	1667	0,2 ± 0,3	0,9 ± 1,9
Germacrène-D	1713	0,5 ± 0,7	0,7 ± 1,3
Epi-bicyclosesquiphellandrène	1730	0,0 ± 0,1	0,1 ± 0,2
δ-Cadinène	1760	0,6 ± 1,7	0,5 ± 0,9
Cadina-1,4-diène	1783	0,6 ± 1,4	0,0 ± 0,2
Cis-calamenène	1853	0,3 ± 1,3	0,4 ± 1,0
Oxyde de caryophyllène	1987	0,4 ± 1,1	0,4 ± 1,1
Elémol	2083	0,0 ± 0,1	0,0 ± 0,1
Nérolidol	2089	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,1
γ-Eudésmol	2166	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
Torréol	2147	0,0 ± 0,1	0,0 ± 0,0
Levoménol	2197	0,0 ± 0,1	0,1 ± 0,2
α-Eudésmol	2205	0,0 ± 0,1	0,0 ± 0,1
β-Eudésmol	2213	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,1
Driminol	2287	0,0 ± 0,1	0,0 ± 0,1

a: n = 30 b: n = 38

Le tableau 4 résume la composition chimique des huiles essentielles de *C. fragrans* trouvée par différents auteurs

Tableau 4 : Composition chimique des huiles essentielles de *C. fragrans* trouvée par d'autres auteurs (% relatif)

Constituant	Schulte et al. (1972)	Ranaivoarisoa et al. (1996)	Razanamparany (2005)	Ravoninahitra (2005)	Tomboarisendra (2005)	Ranaivosoa (2006)	Arnal et al. (2007)
α -pinène	0,6	11,15	1,98	3,31	4,02	1,79	6
Camphène	-	-	-	-	-	0,09	-
Sabinène	-	-	3,02	8,65	0,88	8,67	-
β -pinène	1,7	11,32	4,94	5,28	3,36	1,85	10
Myrcène	-	11,47	0,77	1,83	0,5	2,18	-
β -terpinène	-	2,25	0,32	0,82	tr	1,1	-
Terpinolène	-	-	tr	-	tr	0,27	-
Limonène	-	-	0,53	4,32	1,04	9,7	6
Trans- β -ocymène	-	-	0,44	1,03	-	tr	-
Cis- β -ocymène	-	-	0,75	0,79	-	-	-
α -phellandène	-	0,39	-	-	-	-	-
γ -terpinène	-	-	0,9	1,46	tr	1,12	-
p-cymène	-	-	2,27	0,44	0,75	-	-
Ylangène	-	-	0,59	-	tr	-	-
1,8-cinéole	0,9	-	54,19	43,43	42,01	44,2	54
Linalol	12,6	20,12	6,02	4,81	11,38	4,58	10
Terpinène 4-ol	-	1,33	4,62	2,95	3,2	5,87	6
α -cubebène	-	-	-	-	-	0,11	-
δ -élémente	-	-	-	-	0,49	-	-
β -caryophyllène	7,5	0,89	0,36	0,79	0,62	0,18	-
Cis- β -farnésène	-	-	0,29	-	-	-	-
Acétate de terpényle	-	-	-	4,87	-	-	4
muurolène	-	-	0,86	-	0,62	0,78	-
α - terpinéol	-	-	6,21	6,69	4,24	-	4
δ -cadinène	-	-	0,29	-	-	0,49	-
Alloaromadendrène	-	0,95	-	0,31	0,59	0,78	-
Cis-nérolidol	-	-	0,51	-	1,03	0,21	-
Trans-nérolidol	-	0,46	-	-	-	-	-
Davanone	-	-	-	-	1,18	0,32	-
Léol	-	1,98	-	-	0,4	0,22	-
Cubénol	-	0,41	0,31	0,32	0,56	0,52	-
Tiglate de géranyle	-	-	1,81	-	-	0,16	-
δ -cadinol	-	-	-	-	-	0,28	-
γ - cadinol	-	1,15	0,48	-	-	-	-
Benzoate de benzyle	-	-	0,53	-	1,16	0,08	-
Acide gérannique	-	-	-	-	-	0,8	-
Trans-muurolol	-	3,07	-	-	-	-	-
Caryophyllène	-	5,36	2,69	6,82	7,71	9,62	-

D'après le tableau 3, Randrianarivelo *et al.* (2009) ont montré l'existence de deux différents types chimiques: le linalol pour Tsaramandroso (72.5 % \pm 23.3) et le 1,8 cinéole (47,3 % \pm 10,2) pour Mariarano.

Les résultats donnés par la littérature (Tableau 4) présentent une grande variabilité. En effet, une teneur élevée en linalol est remarquée dans l'huile essentielle de Ranaivoarisoa (2000) et Schulte *et al.* (1972) respectivement de 20,12 % et 12,6 %, alors que les autres huiles essentielles étudiées par Ravoninahitra-Ravalison (2005), Razanamparany (2005), Tomboarisendra (2005), Ranaivosoa (2006) et Arnal-Schnebelen *et al.* (2007) présentent une teneur élevée en 1,8 cinéole supérieure à 42 %.

Par ailleurs, α -pinène, β -pinène, myrcène et époxyde de caryophyllène sont présents à une teneur appréciable dans tous les échantillons d'huile essentielle.

Il est à noter aussi que sabinène, limonène et α -terpinéol présente une teneur assez remarquable dans les huiles de Ranaivoarisoa (2000), Ravoninahitra-Ravalison (2005), Razanamparany (2005) ainsi que de Tomboarisendra (2005) alors que ces constituants ne sont pas représentés dans les échantillons de Schulte *et al.* (1972) et Ranaivosoa (2006).

V.3. Composition chimique de l'huile essentielle de *Cinnamosma madagascariensis*

D'après Rasendra (1994) l'huile essentielle de *C. madagascariensis* est caractérisée par une teneur importante en 1,8 cinéole (35,5 %), en α -pinène (2,4 %), en β -pinène (3,4 %), en sabinène (1,47 %), en linalol (6,60 %), en β -caryophyllène (6,69 %), en terpinène-4-ol (4,10 %), en α -humulène (1,60 %), en α -terpinéol (4,20 %), en acétate d'eugényle (1,42 %) et en oxyde de caryophyllène (2,33 %).

D'après Ranaivosoa (2006) les huiles essentielles de *Cinnamosma madagascariensis* présentent 5 groupes chimiques :

- le groupe 1 est caractérisé par des teneurs importantes en linalol (26,48 %) et en 1,8 cinéole (25,39 %);
- le groupe 2 est démarqué par des teneurs élevées en linalol (29,78 %) et en β -pinène (15,35 %);
- le groupe 3 montre une richesse en linalol (28,90 %) et en sabinène (13,45 %);

- le groupe 4 est caractérisé par l' α -terpinène (29,48%) et le linalol (22,80 %) ;
- le groupe 5 présente des teneurs élevées en linalol (23,76 %) et en α -pinène (22,36 %).

V.4. Activités antimicrobiennes

Les travaux effectués par Randrianarivelo *et al.* (2009) ont permis d'apprécier les activités antimicrobiennes des huiles essentielles de *C. fragrans*. En effet, Randrianarivelo *et al.* (2009) ont montré que les huiles essentielles de *C. fragrans* possèdent un large spectre d'activités antimicrobiennes vis-à-vis des différentes souches. Les concentrations minimales inhibitrices et les concentrations minimales bactéricides ont été évaluées entre 0,18 et 5,88 mg/ml pour le type chimique à linalol (95,8 %) et entre 0,37 et 11,8 mg/ml pour le type chimique à 1,8-cinéole (71,6 %) (Tableau 5).

Le tableau 5 donne les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et les concentrations minimales bactéricides (CMB) des huiles essentielles de *Cinnamosma fragrans*.

Tableau 5 : CMI et CMB des huiles essentielles de *C. fragrans* (Randrianarivelo *et al.* 2009)

	(95,8 % linalol)		(71,6 % 1,8-cinéole)	
	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)
<u>Gram +</u>				
<i>M. luteus</i> ATCC 10240	5,88a	5,88a	11,75b	11,75b
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0,18a	0,18a	0,37b	0,73c
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	0,18a	0,18a	0,37b	0,73c
<u>Gram -</u>				
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	5,88c	5,88c	2,93a	5,88c
<i>E. coli</i> 363	1,47a	2,93b	1,47a	1,47a
<i>V. fischeri</i> ATCC 49387	0,73a	0,73a	0,73a	0,73a
<i>V. anguillarum</i> ATCC 19264	1,47a	1,47a	1,47a	1,47a
<i>V. harveyi</i> ATCC 14126	1,47a	1,47a	1,47a	1,47a
<i>V. alginolyticus</i> ATCC 17749	2,93b	2,93b	1,47a	1,47a
<u>Fungi</u>				
<i>F. oxysporum</i> ATCC 695	5,88b		5,88b	

V.5. Huile essentielle de *C. fragrans* : nouvelle alternative aux antibiotiques en aquaculture de crevette

Randrianarivelo *et al.* (2010) ont montré que l'huile essentielle de *C. fragrans* riche en linalol (95,8 %) possède un effet similaire à l'érythromycine et plus active que l'huile essentielle riche en 1,8 cinéole (71,6 %). L'huile essentielle de *C. fragrans* a un potentiel de contrôler la charge bactérienne dans les conditions *in vivo* et d'améliorer le taux de survie des larves de crevette.

Pour l'autre espèce *C. madagascariensis*, il n'y a aucun rapport disponible dans la littérature entre la composition chimique et le pouvoir antibactérien de ses huiles essentielles de feuilles.

Partie II : Démarches méthodologiques

I Méthodes de caractérisation des huiles essentielles de *Cinnamosma* spp.

La comparaison des résultats publiés par différents auteurs sur la composition chimique des huiles essentielles de *Cinnamosma* spp. a montré une grande variabilité. Cependant les causes de cette variabilité ne sont pas encore bien définies. Par ailleurs, les composants aromatiques d'une plante peuvent varier en fonction des facteurs intrinsèques (organes végétatives, cycle végétatif,...) et des facteurs extrinsèques (climat, origine géographique, altitude...). Notre premier objectif spécifique consiste donc à évaluer la variabilité chimique, selon la zone de collecte et de suivre l'évolution des composants majeurs de chaque chémotype identifié, pour chaque espèce, au cours l'année. Le second consiste à comparer la composition chimique des deux espèces en vue d'une exploitation en chimio taxonomie. Ainsi, les modes d'obtentions et de caractérisations chimiques des huiles essentielles seront développés ci après.

I.1. Matériel végétal

En vue d'accéder à la variabilité de la composition chimique de l'huile essentielle de feuilles de deux espèces de *Cinnamosma* spp., la collecte d'échantillon a été effectué arbre par arbre. Environ 400 g de feuilles par arbre sont effeuillées à partir des rameaux prélevés à l'aide d'un échenilloir. 47 échantillons de feuilles sont collectés pour être distillés :

- 27 échantillons de feuilles de *C. fragrans* ont été collectés dans la partie ouest de Madagascar, dans deux zones de la région de Boeny. 14 sont collectés dans un site sur le littoral qui se trouve à Katsepy appartenant au district de Mitsinjo (S15°44'/E46°14') et 13 proviennent de Tsaramandroso, un site qui se trouve à l'intérieur des terres, dans le district d'Ambatoboeny (S16°18'/E47°01') (figure 11, Tableau 6).
- 20 échantillons de *C. madagascariensis* proviennent de deux sites différents. 10 sont issus de la réserve spéciale d'Ambohitantely (S18°11'/E47°17'), sur les hautes terres et 10 ont été collectés dans l'aire protégée de Tampolo à l'est de Madagascar (S17°17'/E49°24') (figure 11, Tableau 6).

Pour évaluer l'incidence de la date de récolte sur la composition chimique des huiles essentielles, deux arbres pour chaque chémotype identifié, ont été choisis et soumis aux prélèvements réguliers à des dates déterminées dans l'année (d'avril 2008 à décembre 2009).

Les matériels suivants sont nécessaires pour la collecte des échantillons :

- un GPS pour la localisation géographique des individus d'arbres ;
- une fiche de collecte ;
- un échenilloir ;
- un sécateur ;
- un mètre ruban ;
- une balance ;
- des sacs polyéthylènes à maille large pour le conditionnement.

Les échantillons une fois récoltés sont pesés, puis emballés dans des sacs polyéthylènes à maille large, l'ensemble est numéroté. Les échantillons destinés à l'extraction sont étalés à l'air libre et à l'abri du soleil (Figure 9).



Figure 9 : Conservation des feuilles collectées

La collecte des échantillons est suivie d'un marquage des individus (Figure 10), des relevés des paramètres dendrométriques (hauteur, diamètre) et des herbiers.



Figure 10 : Marquage des individus

I.2. Localisation des sites de collecte

Les échantillons de feuilles ont été collectés dans quatre sites différents : Katsepy, Tsaramandroso, Ambohitantely et Tampolo (Tableau 6, Figure 11).

Tableau 6 : Localisation sites de collecte

Sites	Katsepy	Tsaramandroso	Ambohitantely	Tampolo
Coordonnées	S 15° 44' E 046° 14'	S 16° 18' E 046° 16'	S 18° 11' E 047° 17'	S 17° 17' E 049° 24'
Altitudes (m)	3±1	234±16	541±28	6±4
Nombre	14	13	10	10
Espèce	C. fragrans		C. madagascariensis	
Date de collecte	avr-08			

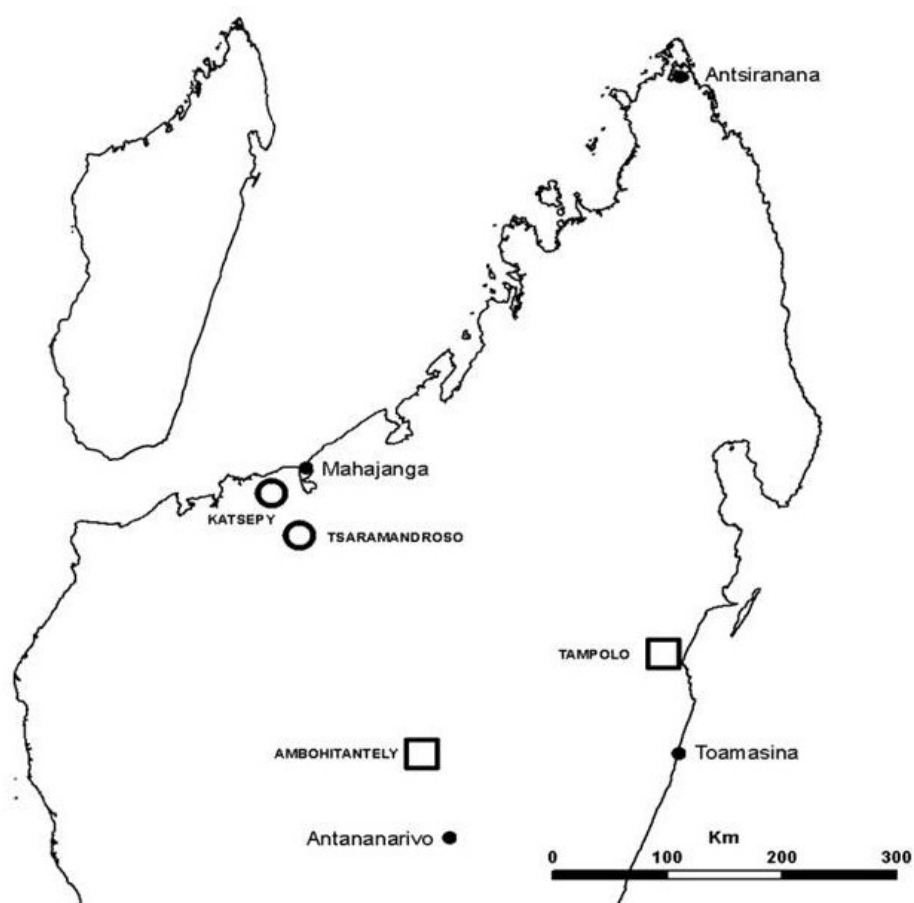


Figure 11 : Carte de localisation des zones d'études

1.2.1 Site de Katsepy

Katsepy se trouve sur la côte ouest, sur le canal de Mozambique. Il est à une heure de traversée avec une petite embarcation venant de Majunga. Les échantillons ont été collectés sur la formation forestière littorale le long de la plage à 2h 30 min de marche par rapport au port de Katsepy.

Le climat est du type tropical de basse altitude, caractérisé par une saison sèche, qualifié d'écosécs ($P < 2T$, où P la précipitation et T la température), de plus de 7 mois commençant en avril et terminant en octobre. Les précipitations mensuelles varient de 4,8 mm en août jusqu'à 360 mm en février. La température moyenne est de 26,6° C.

La courbe ombrothermique de Gaussen (Figure 12) du site obtenue auprès du service météorologique d'Ampandrianomby, permet d'apprécier le comportement du climat.

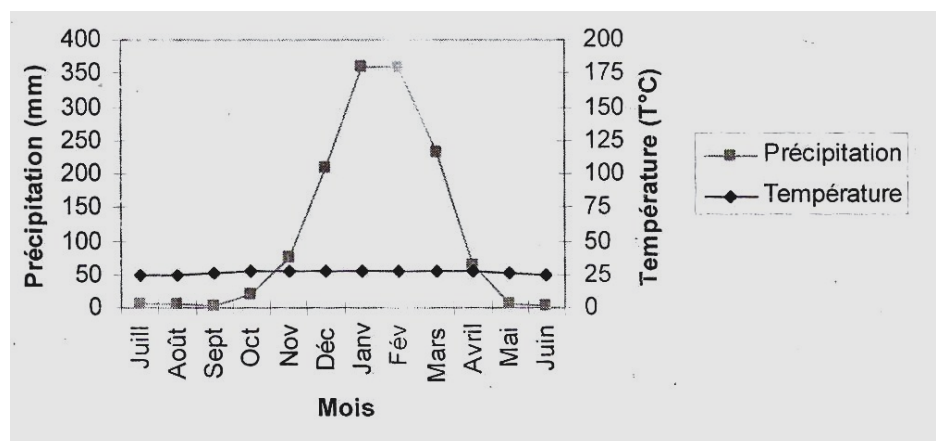


Figure 12 : Courbe ombrothermique de Gaussen de Katsepy

Les sols de la région sont représentés en majeure partie par des sols ferrugineux : sol rouge et jaune.

1.2.2. Site de Tsaramandroso

Tsaramandroso se trouve dans le district d'Ambato Boeny. Il est à 425 Km d'Antananarivo sur la route nationale 4. Les échantillons de feuilles sont collectés dans la forêt dénommée par les habitants de « Garafantsy ». Cette formation forestière se trouve à 3h 30 min de marche par rapport au bord de la RN 4 (PK 428).

La région de Tsaramandroso jouit d'un climat de type tropical continental. L'année se subdivise en deux saisons : la saison chaude et sèche de six mois et la saison chaude et

pluvieuse dont le nombre de jours de pluie est de 68 jours. La précipitation annuelle est de 1302 mm. La température moyenne est de 26,9° C.

La courbe ombrothermique de Gaussen (Figure 13) du site obtenue auprès du service météorologique d'Ampanandrianomby, permet d'apprécier le comportement du climat.

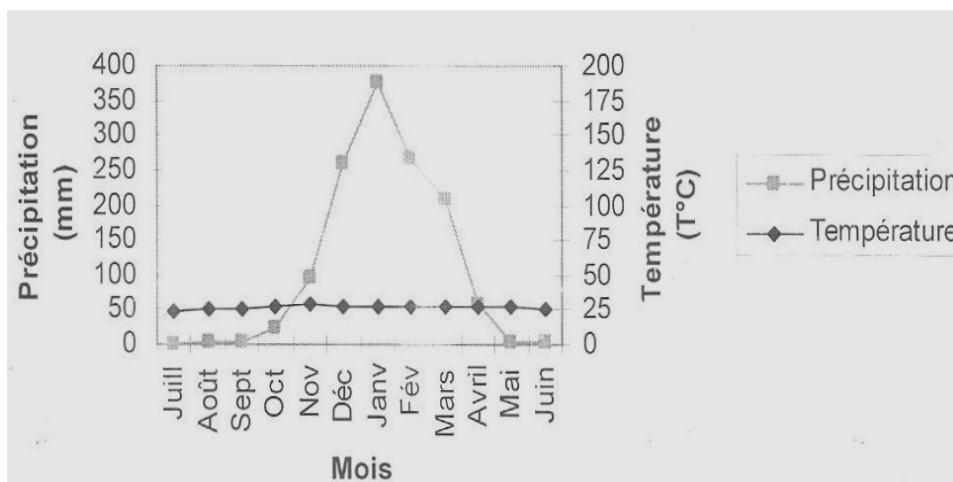


Figure 13 : Courbe ombrothermique de Gaussen de Tsaramandroso

Les sols de la région sont composés par des sols d'origine ferrugineux tropicaux : sols des « tanety » latéritique rouge et sols hydromorphes des bas fonds ou des plaines.

1.2.3. Site de Tampolo

L'aire protégée de Tampolo se trouve dans la région d'Analanjirifo, à 10 Km au nord de Fénérive Est. Elle longe l'ancienne route nationale 5 reliant Toamasina et Maroantsetra. La forêt de Tampolo est encadrée au Nord par le lac de Tampolo, au Sud par une rivière qui se jette dans la mère, à l'Est par l'Océan Indien.

La région de Tampolo est caractérisée par une saison perhumide tout au long de l'année (Précipitation > 100 mm). Il n'existe pratiquement pas de saison sèche. Les pics de précipitation sont au maximum au mois de mars (440, 8 mm) et au minimum en septembre (107,2 mm). La précipitation annuelle est de 2724 mm. La température moyenne est de 24° C.

La courbe ombrothermique de Gaussen (Figure 14) du site obtenue auprès du service météorologique d'Ampanandrianomby, permet d'apprécier le comportement du climat.

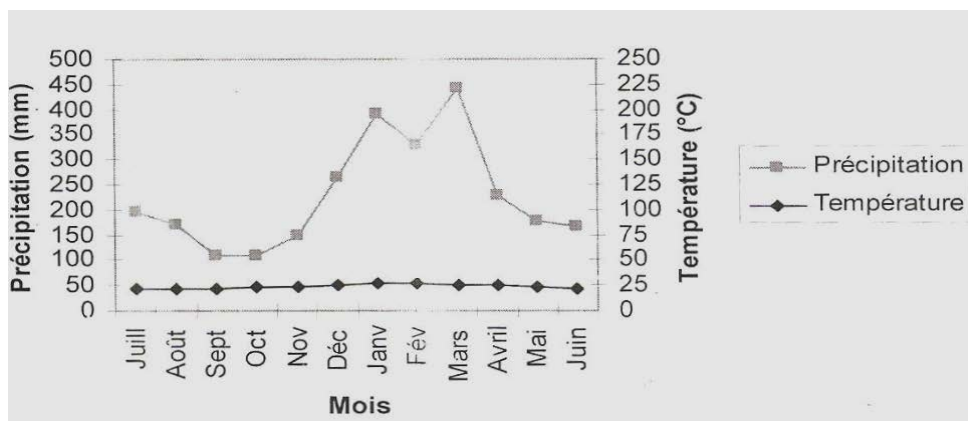


Figure 14 : Courbe ombrothermique de Gaussen de Tampolo

Les sols dans la forêt de Tampolo est généralement de type sablonneux, peu compact et pauvre en matière organique.

1.2.4. Site d'Ambohitantely

La Réserve Spéciale d'Ambohitantely (RSA) est située à 140 Km au Nord d'Antananarivo.

Le climat est de type tropical d'altitude soumis aux influences des alizés. Il est marqué par une saison sèche de mai en septembre. La précipitation annuelle est de 1785 mm. La température moyenne est de 16,7° C.

La courbe ombrothermique de Gaussen (Figure 15) du site obtenue auprès du service météorologique d'Ampandrianomby, permet d'apprécier le comportement du climat.

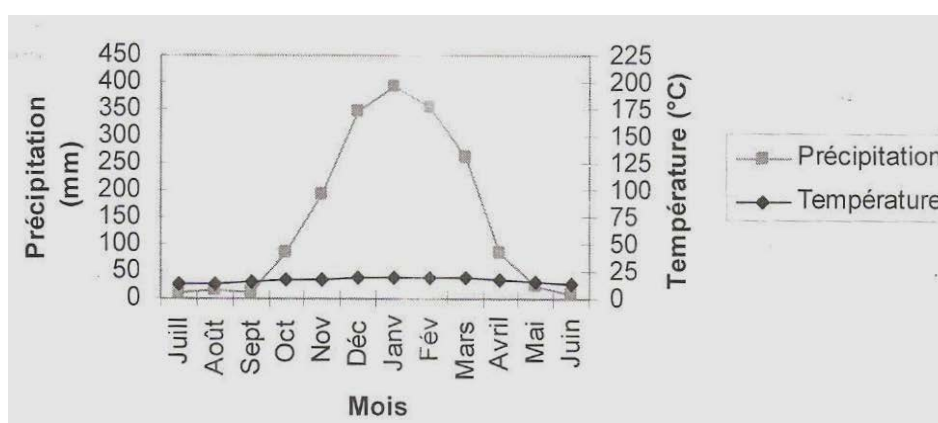


Figure 15 : Courbe ombrothermique de Gaussen d'Ambohitantely

Les sols de la région sont généralement ferrallitiques jaunes sur rouge lessivés.

I.3. Procédure d'extraction

Le matériel végétal (environ 400g) de chaque arbre a été soumis à l'hydrodistillation dans un appareillage de type Clevenger modifié (Figure 16). Le matériel végétal est distillé au laboratoire du FOFIFA dans un laps de temps ne dépassant pas en général une semaine après la collecte.

Le dispositif de distillation utilisé permet de travailler simultanément avec six ballons rodé de deux litres, surmontés chacun d'un essencier gradué et d'un réfrigérant. L'échantillon est introduit dans le ballon, et une quantité d'eau suffisante (environ un litre) est ajoutée pour que l'ensemble soit à moitié immergé. Le mélange est porté à ébullition. Les vapeurs se condensent au niveau du réfrigérant et le distillat à l'aspect trouble dans un premier temps, se décante dans le séparateur en deux phases : l'huile essentielle constitue la phase supérieure tandis que la phase aqueuse inférieure (eau florale) est recyclée durant toute la distillation.

L'ébullition est maintenue pendant 4 heures au début de l'étude et la durée est basée sur 3 heures par la suite après l'étude de la cinétique de distillation. A la fin de l'expérience, le volume de l'huile essentielle recueillie est noté. L'eau a été éliminée d'une manière définitive dans les huiles obtenues par utilisation d'une seringue et les rendements par rapport à la matière sèche ont été évalués. Les huiles extraites ont été stockées dans un endroit frais (4°C) avant toutes analyses (Annexe 1 : mode opératoire).



Figure 16 : Dispositif d'hydrodistillation

I.4. Détermination de la teneur en eau et rendement en huile

La teneur en eau a été mesurée pour chaque échantillon pour exprimer les rendements par rapport au poids sec et pour pouvoir comparer les rendements quel que soit le délai de la distillation après collecte.

Le rendement (%) en huile est exprimé en ml par 100 g de matière sèche.

I.4.1. Détermination de la teneur en eau

Une prise d'humidité a été effectuée pour chaque échantillon. 5 g d'échantillon par lot de feuilles collectées sont mis à sécher dans une étuve réglée à 102°C jusqu'à poids constant (Annexe 2 : mode opératoire). Après refroidissement dans le dessiccateur, l'humidité est calculée à partir de la formule suivante :

$$\% H = [(m_0 - m) / m_0] \times 100$$

Où % H : pourcentage d'humidité ;

m_0 : masse de l'échantillon avant l'étuvage ;

m : masse de l'échantillon après l'étuvage.

I.4.2. Détermination du rendement en huile

Le rendement en huile essentielle est calculé par la formule suivante (Annexe 3 : mode opératoire) :

$$\text{Rdt (\%)} = (v / p) \times 100$$

Où Rdt : rendement en huile essentielle (exprimé en volume d'huile essentielle recueillie en ml par 100g de la matière sèche) ;

V : volume récupéré (ml) ;

P : poids sec du matériel végétal utilisé (g).

Remarque : Si la densité de l'huile a été déterminée, le rendement peut être exprimé en g par 100 g de MS (p/p), qui est l'unité plus utilisée par les industriels pour la commercialisation.

I.5. Couplage Chromatographie en phase gazeuse et Spectrométrie de Masse (CPG/SM)

La technique de couplage de la Chromatographie en phase gazeuse avec la Spectrométrie de Masse offre une possibilité capitale d'identification des composants volatils d'un mélange. Toutes les analyses des huiles essentielles par CPG/SM ont été effectuées dans le laboratoire de la maison de la technologie du CIRAD à Montpellier.

Les échantillons d'huile essentielle ont été analysés par CPG/SM en utilisant une chromatographie gazeuse du type Network 6890, équipé d'un injecteur on-column programmé de 40°C à 240°C et d'un Gerstel Mps (Gerstel GmbH & Co. KG) combiné d'un Aligent MSD 5973 N (mass selective detector; scan range 40 to 400 Dalton) (Agilent Technologies, Santa Clara, California) (Figure 17). Conditions : DB- Wax (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) sur silice fondue de 30m de long, 0,25mm d'identification et d'un film d'épaisseur de 0,25µm; Température du four programmée de 40°C à 170°C pour un débit de 3°C par minute, puis 240° à 10°C par minute . L'hélium est le gaz vecteur avec un débit de 1ml par minute ; Le volume d'injection est de 1µl (1µl d'huile essentielle dilué dans 1ml d'hexane : dilution 1/1000). Les indices de rétention de chaque constituant ont été déterminés à partir des temps de rétention de la série de n-alcanes (C5 – C20) (Gancel *et al.*, 2005; Randrianarivelo *et al.*, 2009). Toutes les analyses en CPG/SM ont été répétées trois fois afin de vérifier la reproductibilité des résultats (Annexe 6 : mode opératoire).



Figure 17 : Appareil de spectrométrie de masse du type Network 5973

I.6.1. Identification des constituants

L'identification des constituants a été assignée sur la base de la comparaison des indices de rétention et des spectres de masse avec ceux de la banque de données Wiley, NIST-2 (National Institutes of Standards and Technology) et CIRAD arômes librairies en utilisant des logiciels software CHEMSTATION et AMDIS 32 (Liang *et al.*, 2009; Lukas *et al.*, 2009).

I.6.2. Quantification des constituants

La concentration de chaque constituant correspond au pourcentage relatif de la surface absolue de chaque pic obtenue par la mesure d'intégration électronique sur CPG/SM sans tenir compte du facteur de réponse.

I.7. Détermination des caractéristiques physico- chimiques

La détermination des caractéristiques physico – chimiques de tous les échantillons a été effectuée au laboratoire du département des Industries Agricoles et Alimentaires de l'ESSA.

Les méthodes physico-chimiques permettent de définir les caractéristiques physiques des huiles essentielles qui constituent des critères d'évaluation de leur qualité dont les valeurs sont données dans les Normes pour la plupart des huiles essentielles commerciales.

Les caractéristiques physico-chimiques ont été déterminées selon l'Association Française de Normalisation (AFNOR).

I.7.1. Densité relative selon la norme NF T 75-111 /ISO 279-2000

La densité relative à 20 °C d'un extrait aromatique est le rapport de la masse d'un volume d'extrait aromatique à 20 °C à la masse d'un égal volume d'eau distillée à cette même température. C'est une grandeur sans dimension. Elle est déterminée à l'aide d'un pycnomètre (Figure 18) (Annexe 4 : mode opératoire).

Cette densité est déterminée par :

$$d_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Où m_0 : masse en gramme du pycnomètre à vide
 m_1 : masse en gramme du pycnomètre rempli d'eau distillée
 m_2 : masse en gramme du pycnomètre rempli de composé aromatique



Figure 18: Pycnomètre

I.7.2. Indice de réfraction selon la norme NF T 75-112 /ISO 280-2000

L'indice de réfraction d'un composé aromatique est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans le composé aromatique maintenue à une température constante. Il est déterminé à l'aide d'un réfractomètre d'ABBE (Figure 19). La température de référence se situe à 20° C. La source lumineuse utilisée est la lumière du jour (Annexe 5 : mode opératoire).

Cet indice est donné par :

$$n_D^t = n_D^{t'} + 0,0004 (t' - t)$$

Où : $n_D^{t'}$ = lecture à la température t'
 t' = température à laquelle la lecture est effectuée
 t = température de 20°C



Figure 19: Réfractomètre

I.8. Détermination des caractéristiques organoleptiques

Les caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles a été effectuées en les observant ou en inhalant directement. Dans cette optique, trois critères ont été considérés pour évaluer la qualité organoleptique :

- L'aspect ;
- L'odeur ;
- La couleur.

10 sujets ont été rassemblés afin d'effectuer les épreuves l'analyse. Leur tâche est d'estimer le degré d'intensité des descripteurs à l'aide d'une fiche d'analyse (Cf annexe 7).

I.9. Huiles essentielles utilisées pour les analyses microbiologiques et les tests en aquaculture de crevettes

Les huiles essentielles utilisées dans les traitements proviennent des mélanges d'échantillons de feuilles de chaque chémotypes identifiés. 400 g de feuilles sur chaque arbre pour chaque chémotype identifié ont été mélangés et homogénéisés. Environ 400 g issus de ce mélange de feuille homogène sont ensuite soumis à l'hydrodistillation pendant 3 heures. Pour confirmation et pour avoir la teneur exacte des constituants chimiques caractérisant chaque chémotype, les huiles essentielles obtenues sont par la suite analysées par CPG/SM.

II Méthodes d'évaluation des activités antimicrobiennes des huiles essentielles de *Cinnamosma* spp. *in vitro*.

Cette partie est consacrée à l'analyse des activités antimicrobiennes des huiles essentielles de *Cinnamosma* spp. *in vitro*.

Toutes les analyses *in vitro* ont été effectuées une partie dans le laboratoire de microbiologie de la faculté des sciences, Département de Biochimie Fondamentale Appliquée (DBFA), université d'Antananarivo et une partie dans le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments (LCSNSA) basé à Institut Universitaire de Technologie (IUT) de Saint Pierre de La Réunion. L'objectif étant de déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et les Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) des huiles essentielles sur les souches de références et les souches isolées dans l'écloserie de crevettes.

II.1. Microorganismes

Les activités antimicrobiennes des huiles essentielles sont évaluées sur 9 souches de références (Tableau 7) et sur les souches de crevettes isolées dans l'écloserie.

Le tableau 7 résume les microorganismes utilisés pour le test antimicrobien.

Tableau 7 : Souches de références utilisées pour le test antimicrobien

Microorganismes			
Gram -	Références	Gram +	Références
<i>Escherichia coli</i>	CCM 4516	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATTC 29212
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATTC 13883	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATTC 25920
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LMG 1242		
<i>Salmonella antarctica</i>	LMG 3264		
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATTC 9908		
<i>Vibrio harveyi</i>	ATTC 32104		
<i>Vibrio alginolyticus</i>	ATTC 1122		

II.2. Provenance des souches

II.2.1. Souches de référence

Les souches de *Vibrio* spp. ont été obtenues auprès du laboratoire de l'Institut Pasteur (Paris) et les autres appartiennent à la collection du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments (LCSNSA) de l'Institut Universitaire de Technologie (IUT) de Saint Pierre La Réunion. Les souches de *Vibrio* spp. sont maintenues dans Marine Agar (MA) et les autres dans Mueller Hinton Agar (MHA).

II.2.2. Souches sauvages isolées des larves de crevettes

Les souches des crevettes ont été isolées à partir des prélèvements larvaires.

a) Isolement et purification

L'isolement a pour but d'obtenir une colonie isolée et pure à partir d'un mélange de population bactérienne. Une colonie pure est constituée par un ensemble de bactéries appartenant à la même espèce. En effet, 4 colonies par bac d'essai suivant les jours d'élevage J₀, J₉ et J₁₈ sont isolées et repiquées jusqu'à l'obtention de colonies pures suivant la méthode d'épuisement de strie en zigzag (technique de quadrant et quadrillage).

Le tableau 8 résume le nombre total de souches isolées suivant les jours d'élevage J₀, J₉ et J₁₈ pour chaque traitement.

Tableau 8 : Nombre total de souches isolées

		J ₀ (stade N1)	J ₉ (stade M1)	Jour ₁₈ (stade PL 8)
		Nombre d'isolats		
E	Essai 1	4	4	4
	Essai 2	4	4	4
	Essai 3	4	4	4
HE ₁	Essai 1	4	4	4
	Essai 2	4	4	4
	Essai 3	4	4	4
HE ₂	Essai 1	4	4	4
	Essai 2	4	4	4
	Essai 3	4	4	4
HE ₃	Essai 1	4	4	4
	Essai 2	4	4	4
	Essai 3	4	4	4
T	Essai 1	4	4	4
	Essai 2	4	4	4
	Essai 3	4	4	4
Nombre total d'isolats		60	60	60

E : Erythromycine ; HE₁ : Huile essentielle à néral et géraniol ; HE₂ : Huile essentielle à acide gérannique ; HE₃ : Huile essentielle à oxyde de caryophyllène ; T : Témoin

D'après le tableau 8, 180 souches ont été purifiées et isolées, dont 60 isolées au stade N1 (J₀), 60 isolées au stade M1 (J₉) et 60 isolées au stade PL 8 (J₁₈).

b) Identification

L'identification a pour objectif de dégager la position taxonomique des bactéries étudiées et leur attribuer par la suite un nom de genre et un nom d'espèce.

Le principe se base sur la détermination des caractères morphologiques, biologiques, biochimiques et physiologiques.

- Coloration de Gram

La coloration de gram est la méthode de coloration la plus utilisée en bactériologie médicale ; elle permet de colorer les bactéries et de les distinguer à l'examen direct par leur aptitude à fixer le violet de gentiane (gram +) ou la fuschine (gram -). (Figure 20).

La coloration de gram est fondée sur l'action successive d'un colorant d'aniline, le cristal violet, d'iode puis d'un mélange d'alcool et d'acétone. Dans un premier temps, le colorant pénètre dans la paroi et le cytoplasme. Dans un second temps, l'iode réagit avec le colorant et le rend insoluble. La perméabilité plus grande des bactéries à gram - à l'alcool permet la décoloration. Les bactéries à gram + restent colorées en violet ou mauve. Une contre-coloration (par exemple en rose) permet de visualiser à nouveau, les corps cellulaires des bactéries à gram -.

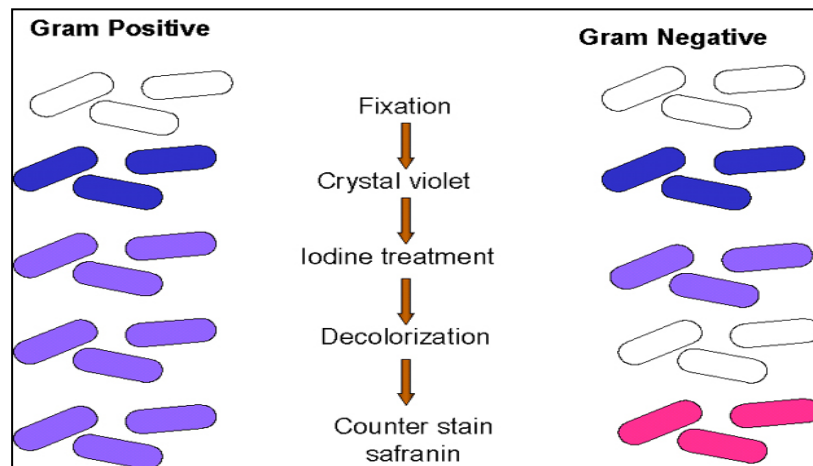
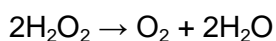


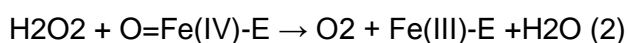
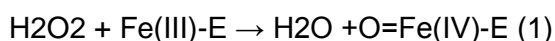
Figure 20: Coloration de gram

- Recherche de catalase

La catalase est une enzyme (N° EC 1.11.1.6) catalysant la dismutation de l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) :



La catalase est formée de quatre chaînes polypeptidiques d'environ 500 acides aminés, comportant chacune un groupe hème. Ces hèmes et leur environnement protéique sont les sites actifs de cette enzyme. Pour catalyser la réaction, l'atome de fer du groupement hème de la catalase réalise une coupure hétérolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène, créant de ce fait une molécule d'eau et un groupement Fe(IV)=O hautement oxydant ; ce dernier peut ensuite oxyder une autre molécule de peroxyde d'hydrogène pour donner du dioxygène. Ce processus est illustré plus spécifiquement par les équations suivantes :



La catalase est utilisée en bactériologie systématique pour l'identification des bactéries. Il s'agit de mettre en contact une colonie de la bactérie à étudier en présence d'eau oxygénée (à 10 volumes). Une effervescence (dû à un dégagement de dioxygène) signe la présence d'une catalase (Figure 19).

La plupart des bactéries à gram - possèdent une catalase (catalase +). La recherche de la catalase sur ce type de bactéries ne présente donc aucun intérêt, sauf un sérovar de *Shigella dysenteriae*. Pour les bactéries à gram +, la recherche de cette enzyme permet de différencier :

- les *Staphylococcus* et *Micrococcus* (catalase +) ;
- les *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc* (catalase -).

La recherche de catalase se fait comme suit : Sur une lame de verre propre, déposer une goutte de H_2O_2 , puis la mettre en contact avec une colonie isolée, prélevée directement avec une pipette pasteur boutonnée ou une anse plastique à usage unique.

- Si formation de bulle, la bactérie possède la catalase (Figure 21).
- Si rien n'est observable, la bactérie ne possède pas l'enzyme.



Figure 21 : Recherche de catalase (formation de bulle)

Remarques : Ne pas utiliser d'anse de platine, car elle réagit avec H_2O_2 et donne un faux positif. Il est déconseillé de faire ce test à partir d'un bouillon de culture ensemencé, car le résultat est moins net. En cas de doute sur le résultat, recommencer avec une plus grosse colonie.

Ce test est important pour la première orientation dans l'identification d'une souche pure bactérienne il permet de différencier les bactéries catalase +/-.

- Recherche de l'oxydase

Le terme d'oxydase désigne une enzyme recherchée en bactériologie systématique. On dit qu'une bactérie est oxydase + si un fragment de culture est capable d'oxyder la forme réduite de dérivés N-méthylés du paraphénylènediamine en semi-quinone (rose violacé).

La présence d'oxydase serait liée à celle dans la chaîne respiratoire du complexe enzymatique IV (cytochrome-oxydase). Certains bactériologistes préfèrent parler de cytochrome-oxydase plutôt que d'oxydase.

Exemples de bactéries cytochrome-oxydase + : *Vibrio* ; *Pseudomonas* ; *Neisseria* ;...

Exemples de bactéries cytochrome-oxydase - : *Enterobacteriaceae*

La recherche d'oxydase est un test fondamental pour orienter l'identification des bacilles gram -. On utilise comme réactif le chlorhydrate ou le PDA, on l'utilise généralement avec des disques imprégnés de ce réactif (disques oxydases). Sur une lame, on place un disque imprégné du réactif et on dépose après une colonie avec une pipette pasteur. S'il y a apparition d'une tache violette au bout de 30 sec, on conclut que la bactérie est oxydase + et qu'elle possède la cytochrome oxydase. L'absence de coloration veut dire que la bactérie est oxydase - et qu'elle ne possède pas l'enzyme respiratoire (cytochrome oxydase) (Figure 22).

La recherche d'oxydase est un test fondamental pour orienter l'identification des bacilles Gram - .



Figure 22 : Recherche de l'oxydase

- *Identification avec Galerie API*

Les galeries API utilisent plusieurs types de tests : étude de la fermentation de divers glucides, auxanogramme, recherche directe d'un enzyme. Chaque tubule contient un substrat différent sur lequel le micro-organisme considéré va réagir. Ils sont remplis d'une suspension bactérienne calibrée (de densité différente selon la galerie). Pour les substrats dont le sigle est encadré, la cupule doit aussi être remplie de manière à créer un ménisque. Pour les substrats dont le sigle est souligné, la cupule doit être remplie d'huile de paraffine soit pour créer l'anaérobiose (absence d'oxygène), soit pour maintenir en solution les ions volatils produits par la réaction et ainsi assurer le virage de l'indicateur coloré de pH.

Les creux du support de la galerie doivent être remplis d'eau pour former une chambre humide, puis la galerie est posée dans le support et le couvercle par-dessus. L'ensemble est incubé à une température adaptée pendant 24 à 48h.

Après addition des réactifs nécessaires à la révélation de différents tests, la galerie est lue conformément aux indications du fabricant et codée. Pour cela, les tests sont groupés par trois successivement de gauche à droite, les derniers triplets pouvant inclure des caractères bactériens comme la morphologie, le gram, la mobilité, l'oxydase, la catalase, etc. qui ne sont étudiés dans la galerie mais qui sont indispensables à son interprétation. Les tests négatifs sont toujours codés 0 alors que le code affecté aux tests positifs varie selon la position du test dans le triplet : 1 pour le premier test, 2 pour le second, 4 pour le troisième. Les 3 résultats du triplet sont additionnés (il existe seulement huit possibilités pour la somme d'un triplet : 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7). Les sommes de chaque triplet lues de gauche à droite forment un code d'au moins 7 chiffres qui correspond au profil biochimique du micro-organisme étudié. La comparaison de ce code à ceux référencés dans la base de données gérée par Biomérieux, en utilisant le logiciel d'identification apiweb™ (Réf. 40 011), permet en général d'identifier le nom de l'espèce de ce micro-organisme. Si le code numérique obtenu ne figure pas dans cette base de données, il peut s'agir d'un profil ou d'un micro-organisme non référencé, mais la cause la plus fréquente reste un problème technique (inoculum non respecté, paraffine oubliée, réactifs périmés, etc.) (Figure 23) (Annexe 8 : mode opératoire).

Selon les résultats obtenus avec la coloration de gram et les tests de catalase et de l'oxydase, la galerie utilisée sera spécifique.

API-20E : sert à l'identification des entérobactéries et autres bacilles à gram – non fastidieux.

API-20NE : sert à l'identification des bacilles à gram – non entérobactéries et non fastidieux.

API-50CHB : sert à l'identification des bactéries à gram +.



Figure 23 : Identification par API-20

Le tableau 9 montre la lecture de la galerie API 20 NE.

Tableau 9 : Lecture de la galerie miniaturisée Api 20 NE

Tests	Substrat	Enzymes Réactions	Résultats	
			Négatif	Positif
NO3	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 mn	rose
		Réduction des nitrates en azote	ZN / 5 mn	Incolore
TRP	Tryptophane	Formation d'indole	TRP / 3-5 mn	Goutte rouge
GLU	Glucose	Fermentation	Incolore	Jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Bleu à vert	Orange/rose/rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Orange/rose/rouge
ESC	Esculine	Hydrolyse	Jaune	Gris/marron/noir
GEL	Gélatine	Hydrolyse	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment noir
PNPG	p-nitro-phényl-βDgalactopyranoside	B-galactosidase	Incolore	Jaune
GLU	Glucose			
ARA	Arabinose			
MNE	Mannose			
MAN	Mannitol			
NAG	N-acétylglucosamine			
MAL	Maltose			
GNT	Gluconate	Assimilation	Transparence	Trouble
CAP	Caprate			
ADI	Adipate			
MLT	Malate			
CIT	Citate			
PAC	Phényl-acétate			
Ox	Tetraméthyl-p - phénylène diamine			

II.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides

Les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides de chaque chémotype identifié après les analyses chimiques des huiles essentielles de *Cinnamosma* spp. ont été déterminées suivant la méthode de microdilution en milieu liquide (Randrianarivelo *et al.*, 2009 ; Randrianarivelo *et al.*, 2010).

Des précultures de 24h des *Vibrios* spp. sur le milieu Zobell agar et des autres souches sur le milieu Mueller Hinton agar ont été effectués. Ces précultures ont été ensuite suspendues dans des tubes à essais contenant 900µl de Zobell liquide pour les *Vibrio* spp. ou dans du Mueller Hinton broth pour les autres souches. Puis la densité optique à D_{600} de l'inoculum a été ajustée à 0,1 ; puis diluée 100 fois de façon à obtenir une densité de D_{600} de 0,001. 100µl de l'huile essentielle ont été ajoutés dans chaque tube pour donner une concentration finale de 20 ; 10 ; 5 ; 2,5 ; 1,25 ; 0,63 ; 0,31 ; 0,16 ; 0,08 ; 0,04 et 0,02 mg/ml. Un témoin positif contenant la suspension bactérienne sans huile essentielle et un témoin négatif ne contenant que le milieu ont été effectués. Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24h. Après incubation la densité optique a été mesurée.

La CMI correspond donc à la plus faible concentration d'huile essentielle à laquelle on n'observe pas de croissance par rapport au témoin positif. 10 µl du milieu issus des tubes pour lesquels on constate l'absence de croissance ont été ensemencés sur boîte de Pétri dans le milieu Zobell agar pour les *Vibrio* spp. et dans le milieu Mueller Hinton agar pour les autres souches et incubés à 37 °C pendant 24 h. La CMB correspond donc à la plus faible concentration d'huile essentielle qui tue à 99,99 % les bactéries en culture (pas de croissance bactérienne).

Pour évaluer la relation entre les constituants des huiles essentielles de deux *Cinnamosma* spp. et l'activité antimicrobienne, des composants purs, le linalol (LIN), le 1,8 cinéole (CIN), le citral (CIT) (mélange de néral et géraniol), l'oxyde de caryophyllène (CAR) et acide gérannique (GER) ont été aussi testés sur les neuf souches de références et les souches isolées de l'écloserie de crevettes.

III Méthodes d'évaluation de l'effet des huiles essentielles dans des conditions d'élevage réelles

Les analyses *in vivo* ont été effectuées au sein d'une ferme de crevette au Nord Ouest de Madagascar (OSO farming, Les Gambas de l'Ankarana : LGA). L'objectif étant d'évaluer la toxicité ainsi que l'effet des huiles essentielles sur le taux de survie et la concentration bactérienne des larves.

D'après Randrianarivelo *et al.* (2010), les deux huiles essentielles de *C. fragrans*, respectivement caractérisées par la forte teneur en linalol (95,8 %) et 1,8 cinéole (71,6 %), possèdent des activités antimicrobiennes ; et elles ont le potentiel de contrôler la charge bactérienne et d'améliorer le taux de survie des larves. En effet nous n'avons plus effectué les tests *in vivo* sur ces huiles essentielles ; seuls les trois types d'huiles essentielles riches en néral et géraniol, en oxyde de caryophyllène et en acide gérannique ont été testés

III.1. Conditions et suivis d'élevage

Toutes les expérimentations ont été effectuées dans des conditions d'élevage réelles. Les larves sont élevées dans des bacs en PVC de 20 litres (Figure 24 et 25). La technique d'élevage larvaire est classique (apport d'algue et changements d'eau). Les principales données d'élevage sont les suivantes :

- eau de mer préalablement filtrée et stérilisée par UV;
- une densité de 250 larves par litre ;
- une température de l'eau 29° C, assurée par un thermoplongeur réglable;
- une salinité de 32 ‰ ;
- une aération homogène, continue répartie par un diffuseur d'air ;
- un taux d'oxygène dissout de 5% ;
- un éclairage continu (24 h sur 24 h) fournissant 3000 à 4000 Lux ;
- pH de 7,8 ;
- traitements préventifs à l'EDTA (3 à 5 ppm) ;
- traitement curatif, éventuellement antibiotique ;

- une alimentation assurée par les phytoplanctons, artémias, microgranulés ;
- renouvellement de l'eau de 0 à 100 % suivant les stades larvaires.



Figure 24 : Dispositif expérimental pour les analyses in vivo

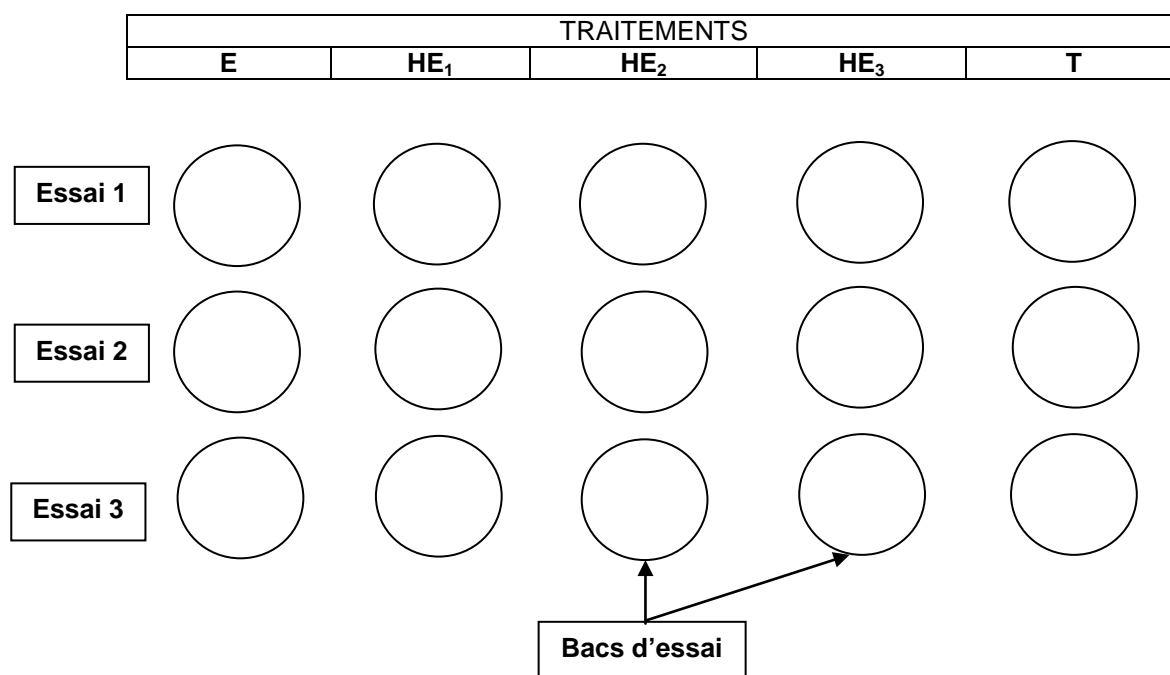


Figure 25 : Schéma simplifié du Dispositif expérimental pour les analyses in vivo

E : Erythromycine ; HE₁ : Huile essentielle à néral et géraniol ; HE₂ : Huile essentielle à acide gérannique ; HE₃ : Huile essentielle à oxyde de caryophyllène ; T : Témoin

III.1.1. Réception et acclimatation des Nauplius

a) Comptage des Nauplius reçus

Le comptage se fait à partir de plusieurs échantillonnages d'un litre après avoir bien homogénéisé l'eau d'élevage par une forte aération.

b) Ensemencement

Après récolte, les Nauplius sont transférés dans le bac d'élevage larvaire de 15 litres. Le volume d'eau initial représente environ 60 % du volume total d'élevage. Ce volume initial d'eau estensemencé avec 400 Nauplius par litre pour aboutir à une concentration finale de 250 larves par litre. Le jour de semis des Nauplius est inscrit comme le jour J_0 , sur la fiche d'élevage du bassin.

III.1.2. Gestion des bacs et des larves (prises des paramètres)

a) Observation des bacs

L'observation des bacs est effectuée chaque matin. Cette observation des bacs permet de juger l'état de propreté des bacs selon les critères suivants :

- Présence d'écume qui se traduit peut être par un signe de chute de bloom d'algue, il convient alors de réagir très rapidement en effectuant un renouvellement d'eau.
- Présence de dépôt d'aliments sur les bords du bac ;
- Couleur de l'eau (bloom d'algue) ;
- Présence ou non d'aliments en quantité suffisante ;

b) Observation des larves

Les larves sont observées deux fois par jour (matin et après midi). Pour les stades critiques Zoé (J_3) à Mysis (J_8), une troisième observation a lieu occasionnellement en cas de problème. L'observation des larves s'effectue en deux niveaux : à l'œil nu et au microscope.

L'observation à l'œil nu est effectuée sur un seul prélèvement par bac dans un bêcher de un litre. Cette observation des larves permet de juger :

- leur activité : nage et phototropisme ;
- leur comportement ;
- la mortalité éventuelle.

Les observations microscopiques se font sur une cinquantaine de larves au minimum. Les larves présentes dans le bêcher de prélèvement sont concentrées avec un tamis placé dans une boîte (Figure 26) (maille de 100 à 300 microns selon les stades larvaires) puis disposées sur une lame à l'aide d'une pipette Pasteur munie d'une poire d'aspiration



Figure 26 : Boîte de prélèvement des larves avec un tamis

L'observation microscopique de l'échantillon permet de déterminer les stades de développement larvaire (en chiffrant la proportion des différents stades et en établissant des commentaires sur la vitesse de développement). Plusieurs paramètres sont à considérés durant l'observation microscopique, entre autres :

- la morphologie : couleur (aliment ingéré de préférence) et pigmentation des larves, déformations morphologiques, contenu stomacal des larves, population des parasites externes dans les branchies et autres parties du corps.

- la propreté des larves : excès d'algues ou d'aliments fixés sur les appendices, présence de protozoaires, présence d'organisme épibiotiques (*Vorticella*, *Epistylis*...).
- la nécroses externes : localisation, % de larves atteintes, origine (attaque bactérienne, mauvaise manipulation des larves...).
- la qualité de l'eau (fèces, mues, parasites).
- le phénomène de cannibalisme.
- la mortalité.

c) Prises des paramètres d'élevage

Les paramètres suivants sont contrôlés trois fois par jour (Tableau 10).

Tableau 10 : Paramètres contrôlés

Paramètres à contrôler	Appareils de mesures
- La température de chaque bac	
- Le taux d'oxygène dissout	
- La salinité	
- Le pH	pH-mètre

Dans tous les cas, il est important de noter les stades des larves que l'on observe pour donner une idée de l'état du bac. Ces observations sont notées sur la fiche de suivi. De ces observations, vont être établies et ajustées les routines quotidiennes d'élevage larvaire. L'importance de ces observations est donc primordiale pour la réussite de l'élevage.

III.1.3. Changement d'eau

Au début de l'élevage larvaire, le volume d'eau est 9 litres (60 % du volume finale). Cela permet d'éviter tout changement d'eau jusqu'à Mysis 3 (J_{10}) et donc de réduire les stressés sur les larves tout en obtenant de très bon taux de survie. L'eau est renouvelée à 25 % au stade PL1 (J_{11}), 50 % au stade PL2 (J_{12}), 50 % au stade PL4 (J_{14}) et 50 % au stade PL6 (J_{16}).

III.1.4. Alimentation des larves

L'alimentation des larves se compose d'algues unicellulaires (*Chaetoceros gracilis*), de Nauplius d'artémias et d'un aliment composé (microcapsules ou microparticules de la marque Frippak). Le plan d'alimentation des bacs larvaires doit être confirmé chaque matin. Pour chaque bac le type d'alimentation (algues, artémias, aliments composés), les quantités et les heures de distribution doivent être indiqués sur le tableau de planning d'alimentation.

Les algues sont distribuées le matin après estimation visuelle de leur concentration dans le bassin d'élevage et après le renouvellement d'eau. Les artémias sont distribués trois fois par jour à partir du stade Mysis1 (J_8). Les aliments composés sont distribués six fois par 24 heures à partir du stade Zoé 1 (J_3)

Le tableau 11 résume la séquence alimentaire des larves.

Tableau 11 : Séquence alimentaire des larves

	Algues 10 ³ C/ml	Artémias U/larve	Aliments composés (Frippak/24h)			
			CD2	PL150	Flakes g/m ³	PL300
0 N1						
1 N6	8					
2 Z1	15 à 20					
3 Z1 - Z2	15 à 20		6			
4 Z2	15 à 20		6			
5 Z2 - Z3	15 à 20		6			
6 Z3	15 à 20		6			
7 Z3 - M1	15 à 20		6			
8 M1		15	3,6	2,4		
9 M2 - M3		25	3	3		
10 M3 - PL1		30	2,4	3,6	2,4	
11 PL1		30		3,6	2,4	
12 PL2		35		3,6	2,4	
13 PL3		40		1,8	2,4	1,8
14 PL4		40			2,4	3,6
15 PL5		40			2,4	3,6
16 PL6		40			2,4	3,6
17 PL7		40			2,4	3,6
18 PL8		40			2,4	3,6

III.2. Détermination de la toxicité des huiles essentielles

La toxicité permet de connaître les effets des différentes concentrations de l'huile essentielle sur les larves. En général, les grandeurs qui caractérisent la toxicité d'une substance donnée sont les suivants :

- la toxicité aiguë qui est la dose acceptant de tuer instantanément les animaux ;
- la DL 100 qui est la plus petite dose qui tue 100% des animaux ;
- la DL 50 qui est la dose qui tue 50% des animaux ;
- la DL 0 qui est la plus grande dose ne pouvant provoquer aucun effet sur les animaux.

Le principe consiste à provoquer la mortalité des animaux par administration en une seule fois de doses décroissantes d'huile essentielle sous des conditions expérimentales bien définies. En effet, des lots pour chaque stade Nauplius, Zoé, Mysis et Post – larves, de densité de 100 larves par litre, ont été élevés dans du bêcher de 2 litres avec une concentration décroissante d'huile essentielle : 0, 100, 200, 400, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 mg/l.

Les caractéristiques physico – chimiques de l'environnement sont identiques à ceux dans des conditions d'élevage réelles (salinité de 32‰, température de 29 °C, taux d'oxygène dissout de 5 %, pH de 7,8). Les huiles essentielles sont administrées dans le bêcher après 1 heure d'acclimatation des larves. Quatre répétitions ont été effectuées pour chaque concentration d'huile essentielle.

Après 24 heures de traitement, les larves sont comptées et la DL 50 est calculée à partir de la formule décrite par (Yilmaz 2004) (Annexe 9 : mode opératoire):

$$DL\ 50 = DL\ 100 - \Sigma (ab) / n$$

Où

a est la différence entre deux doses successives

b est la moyenne du nombre de morts pour deux doses successives

n est le nombre des animaux utilisés pour l'expérience

III.3. Traitements à l'antibiotique et aux huiles essentielles

Les traitements aux huiles essentielles et à l'antibiotique (Erythromycine) sont effectués à 7 heures du matin et pendant les stades larvaires : stade Z1 (J₃), stade Z2 (J₅), stade Z3 (J₇), stade M2 (J₁₀), stade PL1 (J₁₂) et stade PL3 (J₁₄). La concentration de l'érythromycine est de 20µg par ml tandis que celle des huiles essentielles correspond à la plus faible concentration minimale inhibitrice de la croissance des *Vibrio* sp. déterminée *in vitro* par Razafimamonjison *et al.* (2011).

III.3.1. Détermination de l'effet des huiles essentielles sur la concentration bactérienne des larves

15 larves par bac, issus des prélèvements journaliers, sont broyés pendant 20 secondes dans 5 ml de solution saline stérile (NaCl 2%), cette suspension constitue la solution mère. 1 ml de cette solution est ensuite dilué de 1/10 et homogénéisé. Des dilutions en cascade jusqu'à 10^{-5} sont ensuite réalisées.

0,1 ml de la suspension diluée au 10^{-1} à 10^{-5} estensemencé directement dans le milieu Marine Agar (MA) pendant 48 h à 37° C pour les bactéries hétérotrophes aérobies. Chaque ensemencement est effectué en double durant le cycle de 18 jours.

Pour les *Vibrio* spp., un pré enrichissement dans de l'eau alcaline peptonée (1 % de peptone et 1 % de NaCl) de la solution mère est effectuée. En effet, 1ml de la solution mère est additionné de 1ml de l'eau alcaline peptonée, homogénéisée et incubée pendant 12 h à 37° C (pH 8,6). Après incubation, la croissance dans les tubes est indiquée par l'apparition d'une turbidité par rapport au témoin négatif (eau peptonée seulement) non ensemencé. 1 ml de la solution présentant des troubles est ensuite dilué de 1/10 et homogénéisé. Des dilutions en cascade jusqu'à 10^{-5} sont ensuite réalisées.

0,1 ml de la suspension diluée au 10^{-1} à 10^{-5} est ensemencé dans le milieu Thiosulfate Citrate Bile Saccharose agar (TCBS) pendant 24 h à 37° C. Chaque ensemencement est effectué en double durant le cycle de 18 jours. Après incubation, on procède au dénombrement en choisissant la boîte qui contient 30 à 300 colonies (Annexe 10 : mode opératoire).



Figure 27 : Type de broyeur

III.3.2. Evaluation du taux de survie des larves

Le comptage des larves permet de faire une estimation de la population présente dans chaque bac ainsi de visualiser la mortalité et par la suite le taux de survie.

Les comptages sont effectués deux fois par jour, le matin à 10 heures et l'après midi à 16 heures (Figure 28). Pour se faire, on prélève trois échantillons de un litre par bac, après avoir augmenté l'aération au maximum. Les échantillons sont prélevés au niveau du bullage : un à chaque extrémité du bac et un au centre. Aussitôt les trois comptages effectués, on fait la moyenne de larves présentes (vivantes) dans les échantillons. La moyenne des trois comptages multipliée par le volume du bac égal le nombre de larves présentes dans le bac.

A partir de ce nombre de larves présente dans le bac qu'on calcule le taux de survie (Annexe 11 : mode opératoire).

Taux de survie des larves (%) = (nombre total de larves présentes dans chaque bac / nombre total de larves initial) x 100



Figure 28 : Comptage des larves

IV . Méthodes d'analyse statistique

Les informations concernant les méthodes d'analyses statistiques ont été tirées de Diday (1973), Dagnelie (1986), Lespagne (1992), Tomassone *et al.* (1993), Caillez *et al.*, (1996) ; Lebart *et al.* (1997), et

Le traitement des tableaux de données quantitatives sur la composition chimique des huiles essentielles de *Cinnamosma* spp. a été réalisé par les outils statistiques proposés par le logiciel XLSTAT 2011 qui sont :

- l'Analyse en Composantes Principales ou ACP ;
- la Classification Ascendante Hiérarchique ou CAH ;
- l'Analyse Factorielle Discriminante ou AFD.

Les CMI des huiles essentielles vis-à-vis des souches testés ont été comparées (différence significative) par le l'analyse de la variance (ANOVA) proposé par le logiciel XLSTAT 2011.

L'effet des traitements des huiles essentielles sur la concentration bactérienne et le taux de survie a été comparé (différence significative) par le test de Kruskal Wallis proposé par le logiciel XLSTAT 2011.

La corrélation entre le taux de survie et la concentration bactérienne (flore mésophile totale et *Vibrio* sp.) a été étudiée par le test de corrélation de Spearman proposé par le logiciel XLSTAT 2011.

Remarque : Les valeurs de l'unité formatrice de cellule (UFC) ont été transformées en logarithme décimal et que les valeurs du taux de survie ont été changées en Arc Sinus avant toute analyse statistique.

IV.1. Analyse en Composantes Principales (ACP)

L'ACP est une méthode descriptive qui consiste à déterminer les axes factoriels (composantes principales) sur les quels sont projetés les individus (Annexe 12 : mode opératoire).

IV.1.1. Objectifs et principes

L'ACP est une méthode très efficace pour l'analyse des données quantitatives se présentant sous la forme de tableaux à M observations (individus) sur N variables (constituants). Elle permet de :

- visualiser et analyser rapidement les corrélations entre N variables ;
- visualiser et analyser les M observations initialement décrites par N variables sur des graphiques à deux ou trois dimensions, construits de manière à ce que la dispersion entre les données soit aussi bien préservée que possible.

IV.1.2. Interprétations

La représentation des variables sur le cercle de corrélation est d'autant plus significative à mesure que l'on se rapproche du rayon unité. On peut alors déterminer l'origine des axes factoriels et interpréter une relation entre individus et variables.

Deux sortes de corrélations des variables peuvent être interprétées:

- La corrélation significativement positive des variables: Ce sont les variables ayant des coefficients de variation proches de 1 qui présentent les mêmes tendances d'évolution c'est-à-dire que si l'une des variables a un fort pourcentage relatif, alors l'autre présente également la même caractéristique.
- La corrélation significativement négative des variables: Cette corrélation se comprend par les valeurs de variation inverse dans la composition chimique.

Les projections des points individus sur la représentation déformée plane font apparaître des groupes que l'on interprète.

IV.2. Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)

Classier, c'est regrouper entre eux des objets similaires selon tel ou tel critère. Les diverses techniques de classification (ou « d'analyse typologique », de « taxonomie », ou « taxinomie » ou encore « analyse en clusters » (amas)) visent toutes à répartir n individus, caractérisés par p variables X_1, X_2, \dots, X_p en un certain nombre m de groupes aussi homogènes que possible (Annexe 13 : mode opératoire).

IV.2.1. Objectifs et principes

La Classification Ascendante Hiérarchique a pour but de regrouper les individus en classes homogènes en fonction de l'étude de certaines caractéristiques de ces individus. Elle permet de décrire les données en procédant à une réduction du nombre d'individus.

Par classes homogènes, on entend regrouper les individus qui se ressemblent et séparer ceux qui sont éloignés.

La CAH est une méthode de classification itérative dont le principe est simple : On commence par calculer la dissimilarité entre les N objets. Puis on regroupe les deux objets dont le regroupement minimise un critère d'agrégation donné, créant ainsi une classe comprenant ces deux objets. On calcule ensuite la dissimilarité entre cette classe et les $N-2$ autres objets en utilisant le critère d'agrégation. On continue ainsi jusqu'à ce que tous les objets soient regroupés. Ces regroupements successifs produisent un arbre binaire de classification (dendrogramme), dont la racine correspond à la classe regroupant l'ensemble des individus. Ce dendrogramme représente une hiérarchie de partitions.

IV.2.2. Interprétations

Dans l'approche CAH, le critère de qualité d'une partition est d'avoir une inertie intra-classe la plus petite possible (ou d'une manière équivalente une inertie interclasse la plus grande possible) en fonction du nombre de classes de chaque partition.

IV.3. Analyse Factorielle Discriminante (AFD)

L'analyse factorielle discriminante est une méthode qui permet de comparer G groupes à l'aide de plusieurs variables (Annexe 14 : mode opératoire).

IV.3.1. Objectifs et principes

L'AFD cherche à décrire et à classer des groupes d'individus caractérisés par un grand nombre de variables. L'AFD est une analyse qui permet de déterminer les variables les plus explicatives de la répartition en groupes, de mettre en évidence les individus dont les valeurs ne correspondent pas aux groupes auxquels ils appartiennent.

IV.3.2. Interprétations

Les interprétations se font entre les axes factoriels et les variables initiales. L'AFD retrace les corrélations à trois niveaux:

- sur l'ensemble des observations ;
- sur les moyennes des groupes ;
- sur les valeurs individuelles, après élimination des différences entre les groupes.

IV.4. L'analyse de la variance (ANOVA)

IV.4.1. Objectif et principe

L'ANOVA est une des techniques permettant de savoir si une ou plusieurs variables dépendantes (appelées aussi variables endogènes ou variables à expliquer) sont en relation avec une ou plusieurs variables dites indépendantes (ou variables exogènes ou variables explicatives). En utilisant l'outil d'ANOVA de XLSTAT nous cherchons ici à déterminer s'il existe une différence significative entre les différents traitements, et si tel est le cas, quel est le traitement le plus efficace (Annexe 15 : mode opératoire).

IV.4.2. Conditions d'application

Les hypothèses relatives au modèle d'analyse de variances sont nombreuses. L'analyse des résidus est particulièrement utile pour répondre aux hypothèses de normalité et d'homoscédasticité.

- Indépendance

L'indépendance entre les différentes valeurs de la variable mesurée est une condition essentielle à la réalisation de l'analyse de variance. Les p échantillons comparés sont indépendants. L'ensemble des N individus est réparti au hasard (randomisation) entre les p modalités du facteur contrôlé, n_i individus recevant le traitement i .

- Normalité

La variable quantitative étudiée suit une loi normale dans les p populations comparées. La variable aléatoire étudiée Y dont y_{ij} est une représentation, suit une loi normale N sous H_1 . La normalité de la variable pourra être testée à l'aide d'un test de Khi-deux d'ajustement si les effectifs sont suffisamment importants.

Remarque : Si la normalité de la variable n'est pas vérifiée, soit on peut transformer cette dernière, soit avoir recours à l'équivalent non paramétrique de l'ANOVA, le test de Kruskal-Wallis.

- Homoscédasticité

Les p populations comparées ont même variance. Le facteur A agit seulement sur la moyenne de la variable Y et ne change pas sa variance

IV.4.3. Interprétation du test

L'analyse de variance à un facteur teste l'effet d'un facteur contrôlé A ayant p modalités sur les moyennes d'une variable quantitative Y . Après les analyses trois tableaux doivent être observés attentivement : Le tableau d'analyse de la variance, le tableau de l'analyse des résidus, le tableau de test de Tukey HSD (Honestly Significantly Different).

- Interprétation du tableau de l'analyse de la variance

Soient les hypothèses suivantes : Sous H_0 : il n'y a pas d'effet du facteur A sur la variable Y ($\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_i = \dots = \mu_p = \mu$), contre H_1 : le facteur A exerce un effet en moyenne sur la variable Y ($\mu_i \neq \mu_j$)

- si $F_{obs} > F_{seuil}$ (lue dans la table de la loi de Fisher-Snedecor pour un risque d'erreur α fixé et $(p-1, N-p)$ degrés de liberté) l'hypothèse H_0 est rejetée au risque d'erreur α : le facteur contrôlé A a un effet significatif en moyenne sur les valeurs de la variable étudiée.

- si $F_{obs} \leq F_{seuil}$ l'hypothèse H_0 est acceptée: le facteur contrôlé A n'a pas d'effet significatif en moyenne sur les valeurs de la variable étudiée.

- Interprétation du tableau de l'analyse des résidus

Une attention particulière doit être portée aux résidus centrés réduits, qui, étant données les hypothèses liées à l'ANOVA, doivent être distribués suivant une loi normale $N(0,1)$. Cela signifie, entre autres, que 95% des résidus doivent se trouver dans l'intervalle $[-1.96, 1.96]$.

- Interprétation du test de Tukey HSD

Enfin, nous allons pouvoir répondre à notre question initiale: y a-t-il une différence significative entre variables, et si oui, comment peut-on les classer.

IV.5. Test de Kruskal Wallis

Le test de Kruskal-Wallis est souvent utilisé comme une alternative à l'ANOVA dans le cas où l'hypothèse de normalité n'est pas acceptable. Il permet de tester si k échantillons ($k=2$) proviennent de la même population, ou de populations ayant des caractéristiques identiques, au sens d'un paramètre de position (le paramètre de position est conceptuellement proche de la médiane, mais le test de Kruskal-Wallis prend en compte plus d'information que la position au seul sens de la médiane) (Cf annexe : 16 mode opératoire).

Si on désigne par M_i le paramètre de position l'échantillon i , on peut émettre les hypothèses nulle H_0 ($M_1 = M_2 = \dots = M_k$) et alternative H_a (il existe au moins un couple (i, j) tel que $M_i \neq M_j$) du test de Kruskal-Wallis.

IV.6. Test de corrélation selon Spearman

Etudier la corrélation entre deux ou plusieurs variables aléatoires ou statistiques numériques, c'est étudier l'intensité de la liaison qui peut exister entre ces variables. La liaison recherchée est une relation affine. Dans le cas de deux variables numériques, il s'agit de la régression linéaire. Une mesure de cette corrélation est obtenue par le calcul du coefficient de corrélation linéaire. Ce coefficient est égal au rapport de leur covariance et du produit non nul de leurs écarts types. Le coefficient de corrélation est compris entre -1 et 1.

Il est égal à 1 dans le cas où l'une des variables est fonction affine croissante de l'autre variable, à -1 dans le cas où la fonction affine est décroissante. Les valeurs intermédiaires renseignent sur le degré de dépendance linéaire entre les deux variables. Plus le coefficient est proche des valeurs extrêmes -1 et 1, plus la corrélation entre les variables est forte ; on emploie simplement l'expression « fortement corrélées » pour qualifier les deux variables. Une corrélation égale à 0 signifie que les variables sont linéairement indépendantes. Les p-values (le risque estimé), calculées sur la base d'un test bilatéral correspondantes,) permettent aussi de compléter la corrélation entre les variables. Plus la p-valeur est faible, plus la corrélation est significativement différente de 0.

**PARTIE III : Composition chimique des
huiles essentielles de *C. fragrans* et *C.
madagascariensis* – Analyses statistiques des
données**

Notre premier objectif spécifique consiste à évaluer la variabilité chimique, selon la zone de collecte et de suivre l'évolution des composants majeurs de chaque chémotype identifié, pour chaque espèce, au cours l'année. Le second objectif consiste à comparer la composition chimique des deux espèces en vue d'une exploitation en chimio taxonomie.

*I. Huiles essentielles de *Cinnamosma fragrans**

I.1. Composition chimique des huiles essentielles de *Cinnamosma fragrans*.

Le tableau 12 présente la composition chimique de l'huile essentielle de *C. fragrans*.

Tableau 12: Composition chimique de l'huile essentielle de C. fragrans (% relatif).

Composants	IR	C.fragrans		
		Min	Max	Moy ^a
Hydrocarbures monoterpéniques				
α-Pinène	1012	tr	3,69	1,10
Camphène	1058	tr	0,07	0,02
β-Pinène	1107	tr	7,07	2,31
Sabinène	1117	tr	12,52	2,32
Myrcène	1157	0.08	2,55	0,58
α-Terpinène	1169	tr	0,56	0,06
Limonène	1188	0.04	11,60	1,34
β-Phellandrène	1197	-	14,91	0,60
Trans-β-Ocymène	1224	-	1,58	0,42
γ-Terpinène	1233	-	1,39	0,19
Cis-β-Ocymène	1240	tr	3,69	0,66
p-Cymène	1254	tr	3,74	0,69
Terpinolène	1267	-	0,37	0,07
TOTAL				10,36

Suite tableau 12

Composants	IR	C.fragrans		
		Min	Max	Moy ^a
Produits oxygénés monoterpéniques				
1,8 Cinéole	1200	0.04	66,28	15,16
Oxyde de cis-linalol (furanoïde)	1426	tr	6,99	0,72
Oxyde de Trans-linalol (furanoïde)	1553	tr	6,57	0,64
Citronellal	1458	-	1,01	0,30
Linalol	1535	0.27	98,39	20,95
Terpinène-4-ol	1583	-	9,16	1,73
Hotriénol	1597	tr	0,21	0,02
Myrténal	1600	tr	0,51	0,06
Pinocarvéol	1636	-	0,56	0,08
δ-Terpinéol	1653	-	1,34	0,31
Néral	1649	tr	39,18	13,32
Acétate de terpenyle	1673	-	5,79	0,24
α-Terpinéol	1659	0.01	12,11	2,90
Géranial	1710	tr	52,14	18,27
Oxyde de cis-linalol (pyranoïde)	1724	tr	0,83	0,12
Acétate de geranyle	1742	tr	2,61	0,53
Oxyde de Trans-linalol (pyranoïde)	1752	tr	0,64	0,09
Citronéllol	1757	tr	1,85	0,47
Myrténol	1777	-	0,22	0,05
Nérol	1789	-	2,73	0,57
Géraniol	1839	-	18,46	2,04
TOTAL				78,55
Hydrocarbures sesquiterpéniques				
α-Cubebène	1437	-	0,36	0,05
α-Copaène	1468	tr	0,40	0,02
β-Caryophyllène	1570	tr	1,16	0,35
α-Humulène	1641	tr	0,51	0,12
β-Farnesène	1650	-	0,46	0,08
δ-Cadinène	1735	tr	0,95	0,27
Calaménène	1809	-	0,75	0,13
α-Calocarène	1890	-	0,21	0,02
TOTAL				1,04

Suite tableau 12

Composants	IR	C.fragrans		
		Min	Max	Moy ^a
Produits oxygénés monoterpéniques				
Oxyde de caryophyllène	1958	tr	2,39	0,59
Oxyde de humulène	2013	tr	0,65	0,13
Trans Nérolidol	2032	-	0,10	0,01
Cadina-1,4-diol	2035	-	0,29	0,04
Carotol	2043	-	0,27	0,03
Cubénol	2045	tr	0,29	0,04
Viridiflorol	2054	tr	0,04	0,00
Elémol	2064	-	0,01	0,00
α-Vétivone	2089	-	0,00	0,00
β-Vétivone	2113	-	0,56	0,07
δ-Eudésmol	2140	-	0,10	0,02
δ-Cadinol	2161	-	0,20	0,03
α-Eudésmol	2174	tr	0,12	0,01
β-Eudésmol	2179	tr	0,25	0,02
Acide citronéllique	2203	-	0,52	0,03
β-Phellandral	2226	-	0,43	0,06
Hydroxycarvotanacétone	2231	-	0,84	0,08
Acide géranique	2237	tr	55,70	7,68
Intermedéol	2249	-	2,21	0,32
Driménol	2298	-	0,02	0,01
TOTAL				9,16
Autres composés : Tentative d'identification				
6-Methyl-5-heptène-2-one	1321	-	0,97	0,31
Cis-3-Hexène-1-ol	1370	-	0,21	0,03
Trans-3-Hexène-1-ol	1392	-	0,35	0,07
2-hydroxy-1,8-Cinéole	1844	-	0,42	0,07
Cis-Muurool 5-en-4-alpha-ol	1871	-	0,13	0,02
2,6 Dimethyl-3,7-Octadiène -2,6-diol	1944	-	4,23	0,32
4-Allyl-2-methoxyphenol (t)	2190	-	0,09	0,01
Tetracyclo (6,3,2,0 (2,5),0 (1,8) tridecan-9-ol	2214	-	0,88	0,07
TOTAL				0,90
IR: Indices de rétention				
^a : Valeur moyenne (n = 27)				
tr: trace (<0.01%)				
- : non détecté (0.00 %)				

L'analyse par CPG/SM des huiles essentielles de *C. fragrans* a permis de séparer 70 pics représentant les hydrocarbures monoterpéniques, les produits oxygénés monoterpéniques, les hydrocarbures sesquiterpéniques ainsi que les produits oxygénés sesquiterpéniques (Tableau 12):

- les hydrocarbures monoterpéniques représentent 10,36 % de la composition chimique totale de l'huile essentielle de *C. fragrans* : le sabinène, avec une teneur moyenne de 2,31 % et le β -pinène avec une teneur moyenne de 2,31 % sont les constituants majoritaires monoterpéniques ;
- les produits oxygénés monoterpéniques représentent 78,55 % de la composition chimique totale de l'huile essentielle de *C. fragrans* : le linalol, le géraniol, le 1,8 cinéole et le néral sont les constituants majoritaires avec une teneur moyenne respectivement de 20,95 %, 18,27 %, 15,16 % et 13,32 % ;
- les hydrocarbures sesquiterpéniques représentent 1,04 % de la composition chimique totale de l'huile essentielle de *C. fragrans*. le β caryophyllène (0,35 %) est le constituant le plus représenté;
- les produits oxygénés sesquiterpéniques représentent 9,16 % de la composition chimique totale de l'huile essentielle de *C. fragrans* : avec une teneur moyenne de 7,68 %, l'acide gérannique est le principal produit oxygéné sesquiterpénique.

Pour mettre en évidence la variabilité chimique des huiles essentielles de *C. fragrans* des analyses statistiques ont été effectuées.

I.2. Analyse en Composantes Principales (*C. fragrans*)

Dans cette analyse en composantes principales, les individus sont représentés par les 27 échantillons d'huiles issus de 27 arbres et les variables par les 12 constituants représentant une teneur ≥ 5 % dans au moins un échantillon (Annexe 17 : matrice de données).

I.2.1. Test de sphéricité de Bartlett (C. fragrans)

Le tableau 13 montre le test de sphéricité de Bartlett.

Tableau 13: Test de sphéricité de Bartlett (C. fragrans)

Khi ² (Valeur observée)	537,72
Khi ² (Valeur critique)	85,96
DDL	66
p-value	< 0,0001
alpha	0,05

D'après ce test, la valeur critique de Khi² est largement inférieure à Khi² observée au seuil $\alpha = 0,05$. En effet, on peut rejeter l'hypothèse nulle H_0 d'absence de corrélation significative entre les variables et retenir l'hypothèse alternative H_a (au moins l'une des corrélations entre les variables est significativement différente de 0).

I.2.2. Valeurs propres en ACP (C. fragrans)

Les valeurs propres des axes principaux (variance sur les axes principaux), le pourcentage des informations et le pourcentage cumulé des informations sont exposés dans le tableau 14.

Tableau 14 : Valeurs propres des axes principaux en ACP (C. fragrans)

	F1	F2	F3
Valeur propre	5,13	3,096	1,50
Variabilité (%)	42,75	25,80	12,53
% cumulé	42,75	68,55	81,07

La première composante principale (F1) explique 42,75 % de l'information totale. La deuxième composante principale (F2) montre 25,80 %. La combinaison linéaire des deux premières composantes principales est déjà représentative des variables car leur pourcentage cumulé (68,55 %) est supérieur à 50 %. Les 3 premières composantes principales expliquent 81,07 % de l'information totale, ce qui est bien élevé pour représenter les variables.

I.2.3. Caractérisation des variables et des individus (*C. fragrans*)

La figure 29 représente le plan formé par les axes F1 et F2 donnant la corrélation entre les variables.

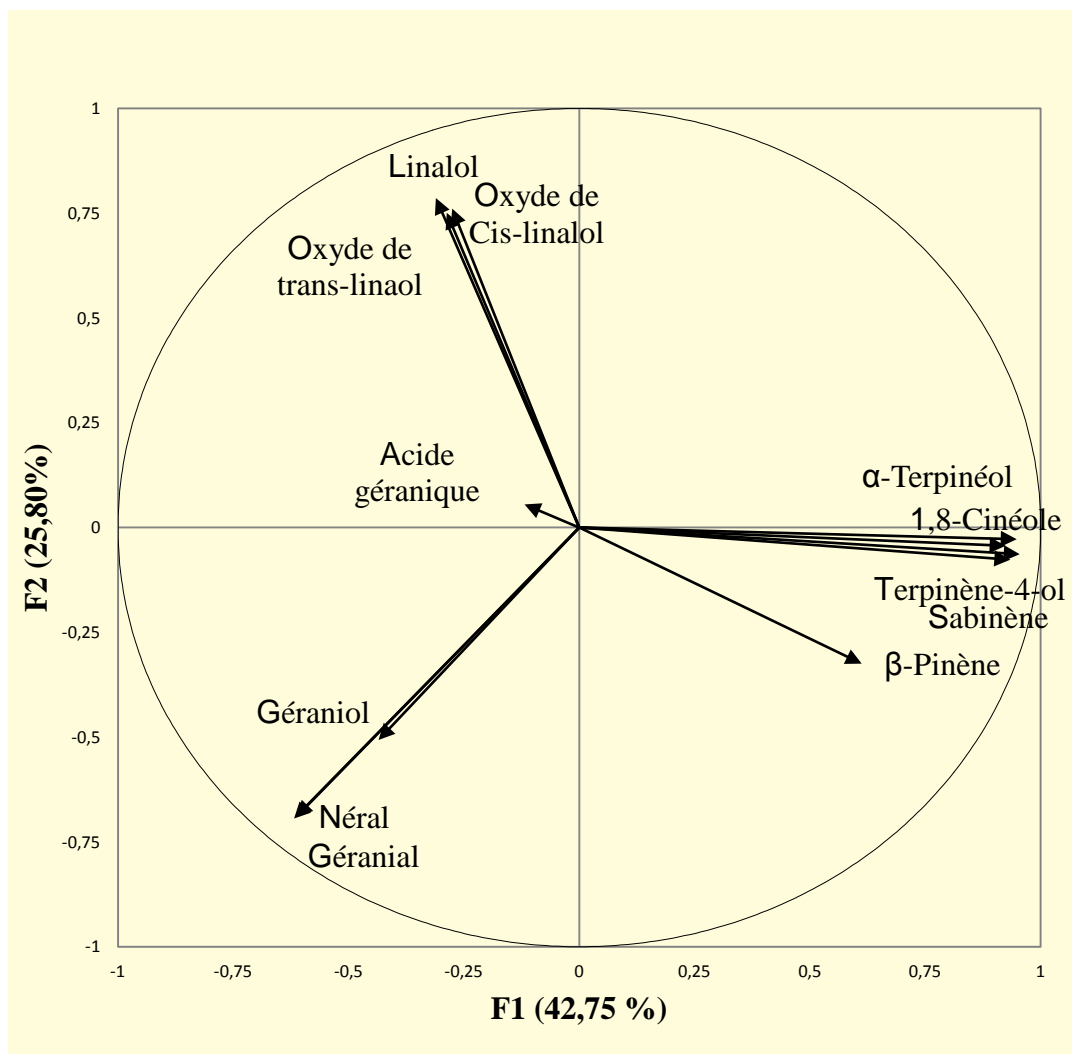


Figure 29 : Cercle de corrélation des variables dans l'ACP (*C. fragrans*)

L'axe F1 est principalement construit par la corrélation positive entre les constituants sabinène (0,92), terpinène 4-ol (0,93), 1,8 cinéole (0,94) et α -terpinéol (0,96). L'axe F2 est formé par le linalol, l'oxyde de cis linalol, l'oxyde de trans linalol et l'acide gérannique, avec une corrélation positive respectivement de 0,78 ; 0,76 ; 0,75 ; 0,07, et trois constituants corrélés négativement : le néral (0,69), le géranial (0,69) et le géraniol (0,51) (Figure 29).

La figure 30 montre la répartition des 27 individus de *C. fragrans* en quatre groupes.

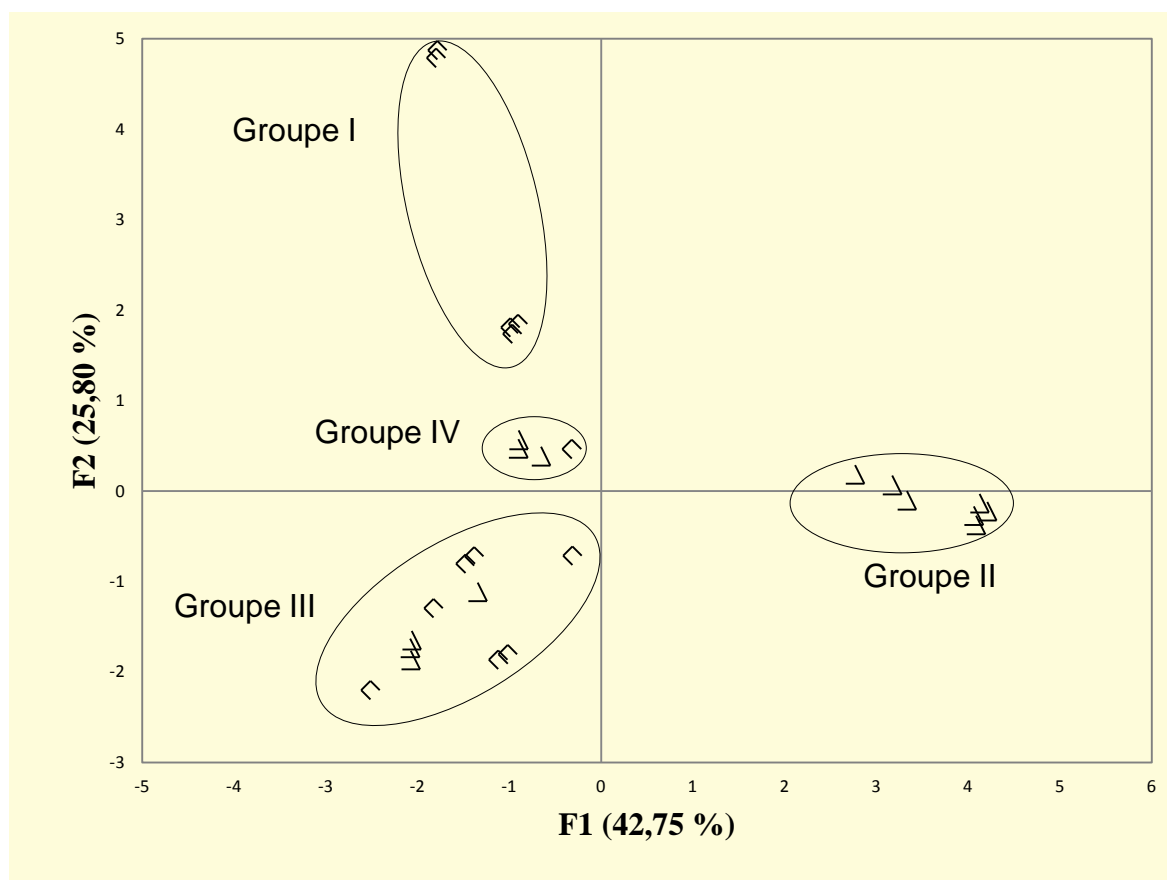


Figure 30 : Répartition des 27 individus de *C. fragrans* en quatre groupes

(Triangle représente les échantillons de Katsepy et losange ceux de Tsaramandroso)

Cette figure montre que les 27 individus de *C. fragrans* sont repartis en quatre groupes :

- le groupe I est formé par 5 individus provenant de Tsaramandroso, caractérisé par la forte teneur en linalol (90,47 %) ;
- le groupe II regroupe 7 individus provenant de Katsepy riches en 1,8 cinéole (56,44 %) ;
- le groupe III est constitué de 11 individus (7 provenant de Tsaramandroso et 4 provenant de Katsepy) caractérisés par le néral et le géraniol à forte concentration respectivement de 30,63 % et de 41,45 % ;
- Le groupe IV est composé de quatre individus (1 provenant de Tsaramandroso et 3 provenant de Katsepy) caractérisés principalement par l'acide gérannique (48,75 %).

Cette répartition des 27 individus de *C. fragrans* par l'ACP sera confirmée par la CAH et par l'AFD.

I.3. Classification Ascendante Hiérarchique (*C. fragrans*)

La classification des 27 individus de *C. fragrans* (Figure 31) a donné quatre classes dont:

- la classe 1 (C1) est formée par 7 individus provenant de Katsepy (K 01, K03, K 04, K 05, K 13, K 14, K 15) correspondant au groupe II de l'ACP;
- la classe 2 (C2) est constituée par 5 individus collectés à Tsaramandroso (T 03, T04, T05, T 09, T 14) correspondant au groupe I de l'ACP;
- la classe 3 (C3) regroupe 1 individu provenant de Tsaramandroso (T 10) et 3 individus provenant de Katsepy (K 09, K 10, K 11) correspondant au groupe IV de l'ACP;
- la classe 4 (C4) est composée par 11 individus dont 7 collectés à Tsaramandroso (T 06, T 07, T 08, T 12, T13, T15, T16) et 4 collectés à Katsepy (K 06, K 07, K 08, K 12) correspondant au groupe III de l'ACP.

La figure 31 montre le dendrogramme de la classification.

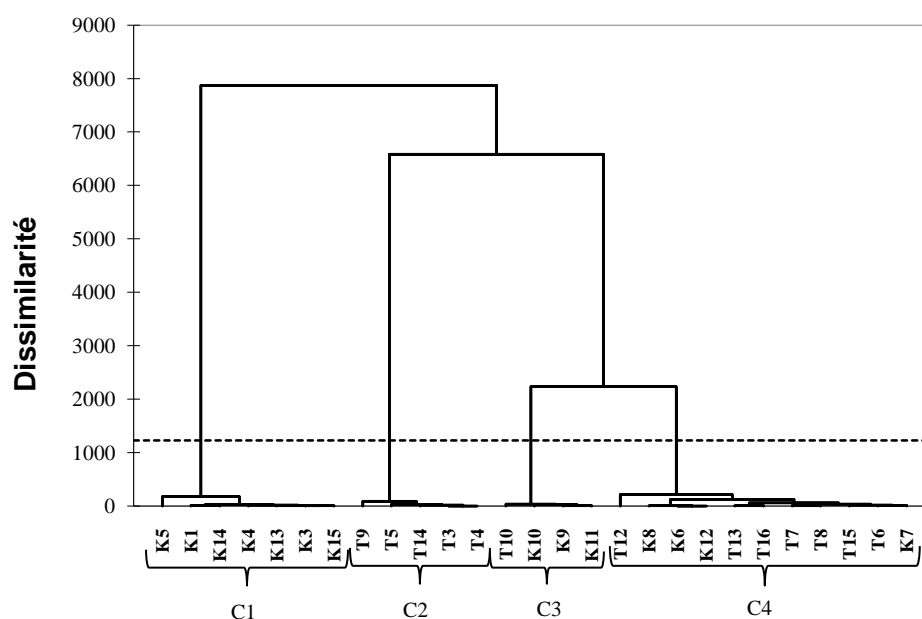


Figure 31 : Dendrogramme de la classification des 27 individus de *C. fragrans*.

I.4. Analyse Factorielle Discriminante (*C. fragrans*)

I.4.1. Test de Lambda de Wilks (*C. fragrans*)

Le test de Lambda de Wilks (Tableau 15) est un test préliminaire dans la méthode AFD.

*Tableau 15: Test de Lambda de Wilks (*C. fragrans*)*

Lambda	0,000
F (Valeur observée)	140,884
F (Valeur critique)	1,756
DDL1	39
DDL2	33
p-value	< 0,0001
alpha	0,05

L'ACP et le CAH ont mis en exergue quatre groupes d'individus bien distincts. D'après ce test de Lambda de Wilks, au seuil de signification alpha de 0,05, on peut rejeter l'hypothèse nulle (H_0) d'égalité des vecteurs espérances des quatre groupes et garder l'hypothèse alternative H_a (au moins l'un des vecteurs moyens est différent d'un autre). La valeur de F critique est inférieure à la valeur de F observée. La différence entre les barycentres des groupes est significative.

I.4.2. Valeurs propres en AFD (*C. fragrans*)

La valeur propre et le pourcentage de l'axe principal sont indiqués dans le tableau 16 suivant:

*Tableau 16: Valeurs propres et pourcentage de variance en AFD (*C. fragrans*)*

	F1	F2	F3
Valeur propre	1027,48	83,71	41,98
Discrimination (%)	89,10	7,26	3,64
% cumulé	89,10	96,36	100

La première composante principale (axe F1) explique 89,10 % de l'information totale. La deuxième composante principale (axe F2) montre 7,26 %. La combinaison linéaire des deux premières composantes principales (96,36 %) est déjà représentative des variables car leur pourcentage cumulé est supérieur à 50 %. Les 3 premières composantes principales expliquent 100 % de l'information totale ; ce qui est bien élevé pour représenter les variables.

I.4.3. Description des classes en AFD (C. fragrans)

Le tableau 17 suivant montre la fréquence des deux groupes formés

Tableau 17: Effectifs des groupes formés (C. fragrans)

Classe	Effectifs	%
1	7	25,926
2	5	18,519
3	4	14,815
4	11	40,741

Les 27 échantillons sont biens repartis et classés dans leur groupe d'appartenance.

I.4.4. Caractérisation des groupes en AFD (C. fragrans)

Le traitement par l'AFD a permis de confirmer que les 27 échantillons sont tous bien classés (à 100 %) dans les quatre groupes établis lors de l'ACP et dans les quatre classes lors de la CAH. La figure 32 montre la représentation graphique des variables en AFD.

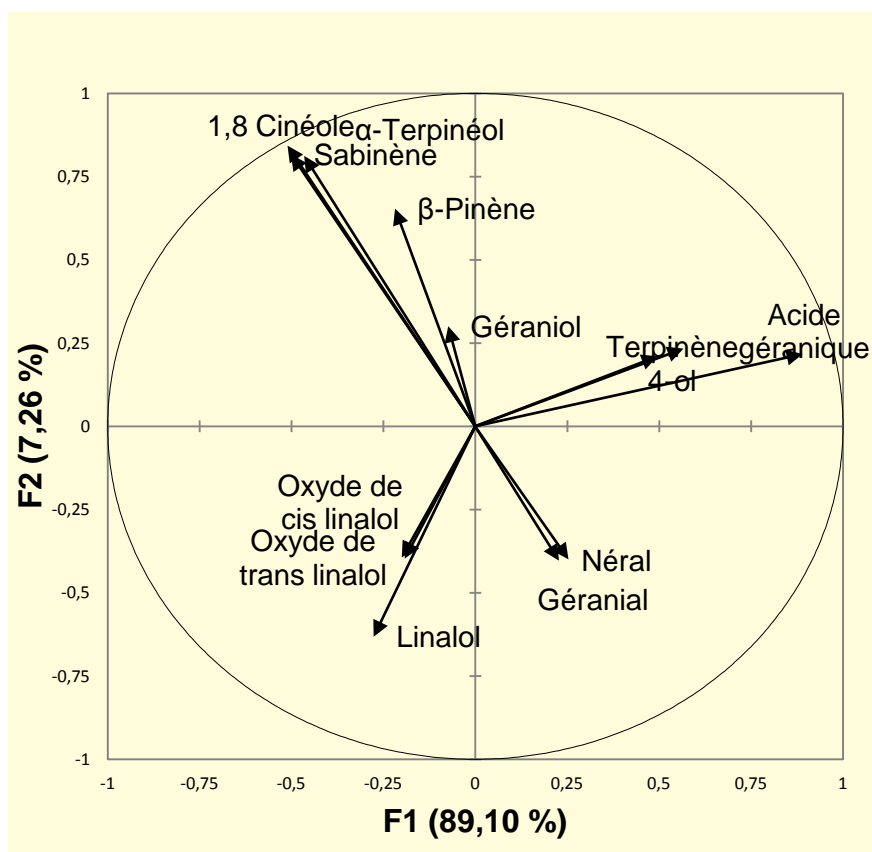


Figure 32: Représentation graphique des variables en AFD pour C. fragrans

La représentation graphique des individus en AFD est montrée dans la figure 33.

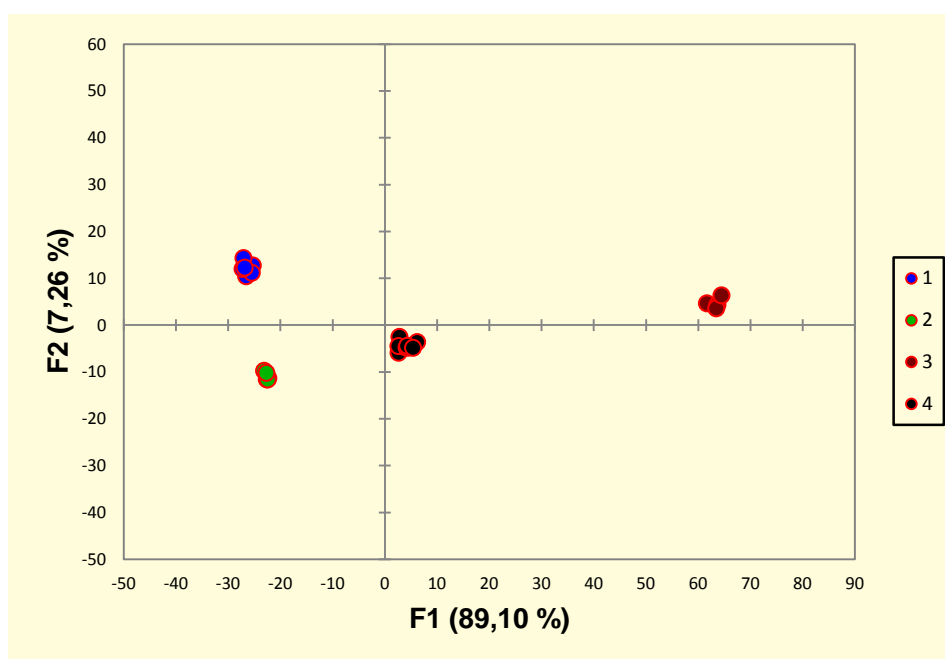


Figure 33: Représentation graphique des individus en AFD pour *C. fragrans*

La figure 34 représente les constituants chimiques des groupes formés en AFD.

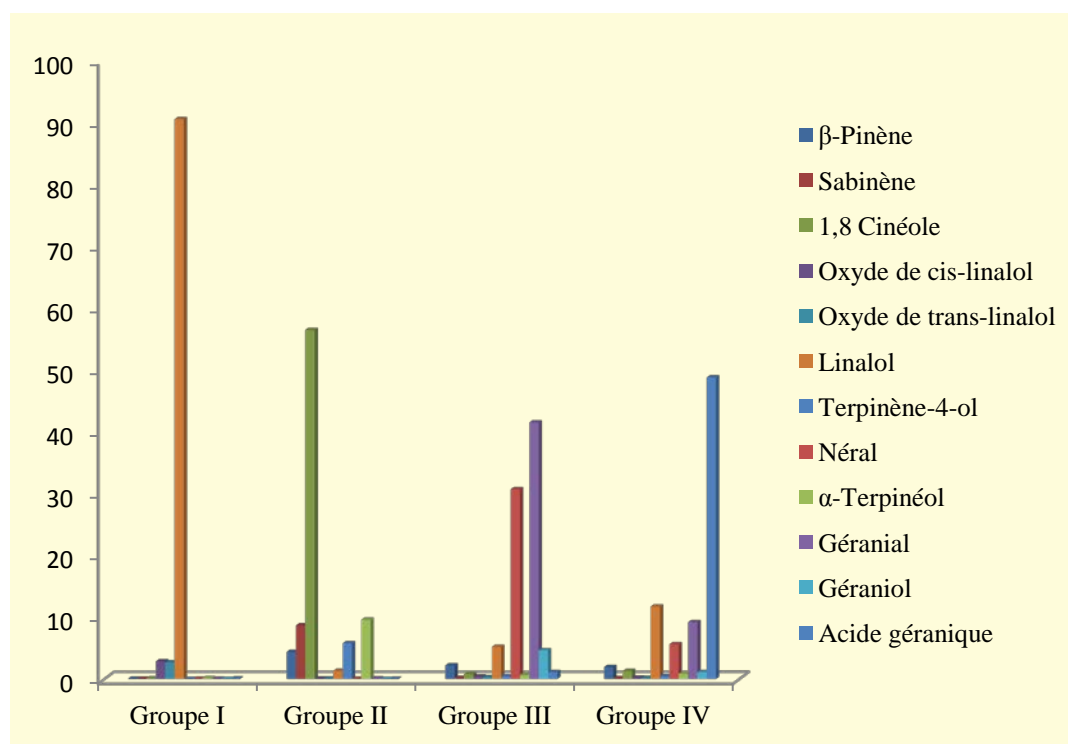


Figure 34: Comparaison des groupes de constituants chimiques des huiles essentielles de *C. fragrans*

Les figures 33, 34 montrent l'existence de quatre groupes chimiques pour les huiles essentielles de *C. fragrans*: le groupe I est caractérisé par la forte teneur en linalol (90,47 %) ; le groupe II est distingué par la teneur élevée en 1,8 cinéole (56,44 %) ; le groupe III se démarque par la richesse en néral (30,63 %) et géraniol (41,45 %) et le groupe IV présente une forte teneur en acide gérannique (48,75 %).

Ces résultats montrent que la répartition des groupes chimiques ne dépend pas de la zone de collecte. La présence des échantillons de Tsaramandroso et de Katsepy dans le groupe III, à teneur élevée en néral et géraniol, et dans le groupe IV, riche en acide gérannique, confirme cette observation.

Le chémotype (ou chimiotype) désigne une entité chimique distincte au sein d'une même espèce. Chaque espèce possède un équipement enzymatique qui oriente vers la formation d'un constituant majoritaire ou de plusieurs constituants biosynthétiquement liés. Ce terme s'applique à tout type de composés chimique appartenant au métabolite secondaire. Les huiles essentielles tiennent une place prépondérante dans ce phénomène.

Ainsi, nous avons attribué à chaque classe formée le nom de chémotype :

- le chémotype I à linalol pour le groupe I ;
- le chémotype II à 1,8 cinéole pour le groupe II ;
- le chémotype III à néral et géraniol pour le groupe III ;
- le chémotype IV à acide gérannique pour le groupe IV.

I.5. Caractérisation chimique de chaque chémotype de l'huile essentielle de *C. fragrans*

Dans cette partie, nous allons spécifier d'une manière exhaustive les propriétés organoleptiques et physico – chimiques de chaque chémotype de l'huile essentielle de *C. fragrans*.

1.5.1. Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles de *C. fragrans*

Le tableau 18 présente les caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles de *C. fragrans*.

*Tableau 18: Caractéristiques organoleptiques de chaque chémotype de l'huile essentielle de *C. fragrans**

	Chémotype			
	I	II	III	IV
Aspect	liquide mobile, limpide et légère			
Odeur	riche et agréable, fortement aromatique			
Couleur	incolore au jaune pâle	jaune pâle à jaune verdâtre	jaune pâle à jaune plus foncé	blanchâtre

La différence de couleur entre les chémotypes laisse supposer des aspects de variabilité qualitative entre les huiles essentielles de *C. fragrans*.

1.5.2. Evaluation du rendement en huile essentielle de *C. fragrans*

Après détermination de l'humidité et de la matière sèche, les échantillons préalablement pesés sont soumis à l'hydrodistillation pour donner des huiles essentielles, recueillies et mesurées afin d'obtenir des rendements qui sont exprimés en ml par 100 g de matière sèche.

Le tableau 19 présente les variations des teneurs en huiles essentielles de *C. fragrans*.

*Tableau 19: Rendement en huile essentielle de *C. fragrans**

Chémotype	Rendement (ml par 100 g de M.S.)		
	Min	Max	Moy
I	0,83	12,9	5,5
II	0,68	10,8	5,3
III	0,59	8,3	4,5
IV	0,65	7,5	3,1

D'après ce tableau, le chémotype I présente un rendement moyen élevé, de l'ordre de 5,5 %, tandis que le chémotype IV donne un rendement faible, de l'ordre de 3,1 %.

I.5.3. Caractéristiques physico – chimiques des huiles essentielles de *C. fragrans*

Le tableau 20 montre les caractéristiques physico – chimiques de chaque chémotype de l'huile essentielle de *C. fragrans*.

*Tableau 20: Caractéristiques physico – chimiques des huiles essentielles de *C. fragrans**

Chémotype	Densité relative			Indice de réfraction		
	Min	Max	Moy	Min	Max	Moy
I	0,8576	0,9201	0,8663	1,4289	1,4697	1,4532
II	0,8856	0,9312	0,8897	1,4398	1,4532	1,4510
III	0,8745	0,9156	0,8987	1,5471	1,5643	1,5517
IV	0,9001	0,9301	0,8998	1,4507	1,4611	1,4555

D'après ce tableau, l'huile essentielle de *C. fragrans* est plus légère que celle de l'eau, avec une densité relative variant de 0,8663 à 0,8998. L'indice de réfraction entre les chémotypes se situe entre 1,4510 et 1,5517.

I.6. Influence de la date de récolte pour chaque chémotype identifié (*C. fragrans*)

Une fois vérifié que la zone de collecte n'est pas responsable de manière significative la classification par chémotypes, nous allons évaluer l'incidence de la date de récolte sur la composition chimique des huiles essentielles à des dates déterminées durant l'année (d'avril 2008 à février 2009). Deux arbres, de chémotype connu, ont été choisis et soumis aux prélèvements réguliers.

I.6.1. Evolution de la composition chimique de chaque chémotype de l'huile essentielle de *C. fragrans* au cours de l'année

Les tableaux 21, 22, 23 et 24 montrent l'évolution de la composition chimique de chaque chémotype durant l'année.

Tableau 21: Evolution de la composition chimique pour le chémotype à linalol au cours de l'année (% relatif).

	Chémotype I (linalol)					
	avr-08	juin-08	août-08	oct-08	déc-08	févr-09
Hydrocarbures monoterpéniques						
α-Pinène	-	-	0,03	0,00	-	-
Camphène	-	-	-	-	-	-
β-Pinène	0,03	-	0,12	0,01	0,02	-
Sabinène	-	-	-	-	-	-
Myrcène	0,05	0,25	0,14	0,21	0,19	0,17
α-Terpinène	-	-	-	-	-	-
Limonène	0,04	0,06	0,03	0,04	0,08	0,04
β-Phellandrène	-	-	-	-	-	-
Trans-β-Ocymène	0,01	0,37	0,16	0,18	0,21	0,21
γ-Terpinène	-	-	-	-	-	-
Cis-β-Ocymène	0,03	0,18	0,10	0,10	0,14	0,17
p-Cymène	-	-	-	-	-	-
Terpinolène	0,06	0,01	-	-	-	-
TOTAL	0,22	0,88	0,58	0,53	0,64	0,59
Produits oxygénés monoterpéniques						
1,8 Cinéole	0,17	0,04	0,01	0,14	0,03	-
Oxyde de cis-linalol (furanoïde)	6,81	6,07	7,37	6,93	7,37	6,64
Oxyde de trans-linalol (furanoïde)	6,46	6,08	7,08	6,64	7,05	6,61
Citronellal	0,05	-	-	-	-	-
Linalol	79,93	86,55	81,98	85,47	84,88	86,14
Terpinène-4-ol	-	-	-	-	-	-
Hotriénol	0,11	0,02	-	-	-	-
Myrténal	0,09	-	0,11	-	-	-
Pinocarvéol	-	-	0,01	-	-	-
δ-Terpinéol	-	-	-	-	-	-
Néral	0,01	-	-	-	-	-
Acétate de terpenyle	-	-	-	-	-	-
α-Terpinéol	0,08	0,16	-	-	-	-
Géranial	0,01	0,15	0,02	0,06	0,03	0,01
Oxyde de cis-linalol (pyranoïde)	0,35	-	-	-	-	-
Acétate de geranyle	-	-	-	-	-	-
Oxyde de trans-linalol (pyranoïde)	0,27	-	-	-	-	-
Citronellol	-	-	-	0,02	-	-
Myrténol	-	-	-	-	-	-
Nérol	-	-	-	-	-	-
Géraninol	-	-	-	-	-	-
TOTAL	94,32	99,06	96,58	99,27	99,36	99,39
Hydrocarbures sesquiterpéniques						
α-Cubebène	-	-	-	-	-	-
α-Copaène	-	-	-	-	-	-
β-Caryophyllène	-	0,04	-	0,19	-	-
α-Humulène	-	-	-	-	-	-
β-Farnésène	-	-	-	-	-	-
δ-Cadinène	0,44	-	0,49	-	-	-
Calaménène	-	-	-	-	-	-
α-Calocarène	-	-	-	-	-	-
TOTAL	0,44	0,04	0,49	0,19	-	-

Suite tableau 21

Produits oxygénés sesquiterpéniques						
Oxyde de caryophyllène	2,20	-	2,28	-	-	-
Oxyde de humulène	0,01	-	-	-	-	-
Trans nérolidol	0,05	-	-	-	-	-
Cadina-1,4-diol	-	-	-	-	-	-
Carotol	-	-	-	-	-	-
Cubénol	-	-	-	-	-	-
Viridiflorol	-	-	-	-	-	-
Elémol	-	-	-	-	-	-
α -Vétivone	-	-	-	-	-	-
β -Vétivone	0,23	-	-	-	-	-
δ -Eudésmol	-	-	-	-	-	-
δ -Cadinol	-	-	-	-	-	-
α -Eudésmol	-	-	-	-	-	-
β -Eudésmol	0,01	-	-	-	-	-
Acide citronellique	-	-	-	-	-	-
β -Phéllandral	0,17	-	-	-	-	-
Hydroxycarvotanacétone	0,03	-	0,01	-	-	-
Acide gérannique	0,08	-	-	-	-	-
Intermedéol	0,01	-	0,04	-	-	-
Driménol	0,02	0,02	0,01	-	-	0,02
TOTAL	2,80	0,02	2,35	0,00	0,00	0,02
Autres composés : Tentative d'identification						
6-Methyl-5-heptène-2-one	-	-	-	-	-	-
Cis-3-Hexène-1-ol	-	-	-	-	-	-
Trans-3-Hexène-1-ol	-	-	-	-	-	-
2-hydroxy-1,8-Cinéole	-	-	-	-	-	-
Cis-Murol 5-en-4- α -ol	-	-	-	-	-	-
2,6 Dimethyl-3,7-Octadiène -2,6-diol	2,13	-	-	-	-	-
4-Allyl-2-methoxyphenol (t)	0,00	-	-	-	-	-
Tetracyclo (6,3,2,0 (2,5),0 (1,8))tridecan-9-ol	0,08	-	-	-	-	-
TOTAL	2,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Rendement (ml/100g de MS)	10,6	10,9	11,03	11	10,9	10,7,

D'après ce tableau, le rendement en huile en ml/100g de M.S. varie de 10,6 à 11,3. Le plus faible rendement (10,6) est observé au mois d'avril, tandis que le plus élevé (11,3) est enregistré au mois d'août. Aucune variation importante de la teneur de chaque groupe de constituant n'est observée durant l'année :

- Hydrocarbures monoterpéniques : 0,22 % - 0,88 %.
- Produits oxygénés monoterpéniques : 99,06 % - 99,58 %.
- Hydrocarbures sesquiterpéniques : 0,00 % - 0,49 %.
- Produits oxygénés sesquiterpéniques : 0,00 % - 2,80 %.

Tableau 22 : Evolution de la composition chimique pour le chémotype à 1,8 cinéole au cours de l'année (% relatif).

	Chémotype II (1,8 cinéole)					
	avr-08	juin-08	août-08	oct-08	déc-08	févr-09
Hydrocarbures monoterpéniques						
α-Pinène	2,57	2,48	2,15	2,41	2,40	3,18
Camphène	0,06	0,03	0,02	0,02	0,02	0,04
β-Pinène	3,77	4,30	4,15	4,40	4,43	5,26
Sabinène	7,22	9,54	8,70	11,48	11,63	9,32
Myrcène	0,92	1,67	1,57	1,97	2,08	2,52
α-Terpinène	0,27	0,62	0,66	0,67	0,87	1,06
Limonène	1,75	1,95	1,70	2,00	2,19	3,00
β-Phellandrène	-	-	-	-	-	-
Trans-β-Ocymène	0,23	1,56	0,75	1,00	1,07	1,42
γ-Terpinène	0,57	2,40	2,05	1,40	2,23	2,42
Cis-β-Ocymène	0,31	0,62	0,64	0,77	1,22	0,94
p-Cymène	2,37	1,59	0,96	0,69	0,52	0,59
Terpinolène	0,18	0,26	0,46	0,30	0,33	0,44
TOTAL	20,21	27,03	23,80	27,13	28,98	30,19
Produits oxygénés monoterpéniques						
1,8 Cinéole	55,27	51,51	52,97	51,30	52,45	50,64
Oxyde de cis-linalol (furanoïde)	0,08	-	-	-	-	-
Oxyde de trans-linalol (furanoïde)	0,06	-	-	-	-	-
Citronellal	0,00	-	-	-	-	-
Linalol	1,88	1,28	1,21	1,35	1,07	1,04
Terpinène-4-ol	7,62	7,13	7,32	5,01	4,21	5,06
Hotriénol	0,09	0,31	1,24	1,96	0,80	1,11
Myrténal	0,26	-	-	-	-	-
Pinocarvéol	0,09	-	-	-	-	-
δ-Terpinéol	1,10	-	-	-	-	-
Néral	0,62	1,12	1,15	1,04	0,95	0,98
Acétate de terpenyle	-	-	-	-	-	-
α-Terpinéol	-	-	-	-	-	-
Géranial	11,12	11,48	12,13	11,20	11,01	11,06
Oxyde de cis-linalol (pyranoïde)	-	-	-	-	-	-
Acétate de géranyle	-	-	-	-	-	-
Oxyde de Trans-linalol (pyranoïde)	-	-	-	-	0,03	-
Citronellol	-	-	-	-	-	-
Myrténol	0,07	-	-	-	-	-
Nérol	0,09	-	-	-	-	-
Géraninol	-	-	0,03	0,02	-	-
TOTAL	78,35	72,83	76,06	71,88	70,53	69,89
Hydrocarbures sesquiterpéniques						
α-Cubebène	0,02	-	-	0,01	-	-
α-Copaène	0,00	-	-	-	-	-
β-Caryophyllène	0,12	0,10	-	-	0,04	-
α-Humulène	0,05	-	-	-	0,00	-
β-Farnesène	0,00	-	0,16	0,69	0,32	0,08
δ-Cadinène	0,00	-	-	-	-	-
Calaménène	0,02	-	-	-	-	-
α-Calocarène	0,10	-	-	-	-	-
TOTAL	0,31	0,10	0,16	0,70	0,36	0,08

Suite tableau 22

Produits oxygénés sesquiterpéniques						
Oxyde de caryophyllène	0,38	-	-	-	-	-
Oxyde de humulène	0,08	-	0,19	0,13	0,03	0,05
Trans nérolidol	-	-	-	-	-	-
Cadina-1,4-diol	-	-	-	-	-	-
Carotol	0,01	-	-	-	-	-
Cubénol	0,01	-	-	0,06	0,08	0,08
Viridiflorol	-	-	-	0,02	0,02	0,01
Elémol	-	-	-	-	-	-
α -Vétivone	-	-	-	-	-	-
β -Vétivone	-	-	-	-	-	-
δ -Eudésmol	0,04	-	-	-	-	-
δ -Cadinol	0,10	-	-	-	-	-
α -Eudésmol	-	-	-	0,01	0,01	-
β -Eudésmol	-	-	-	-	-	-
Acide citronellique	-	-	-	-	-	-
β -Phéllandral	0,21	-	0,03	0,02	-	0,01
Hydroxycarvotanacétone	0,42	0,04	-	-	-	-
Acide géranique	0,01	-	-	0,02	-	0,02
Intermedéol	0,05	-	-	-	-	-
Driménol	-	-	-	0,03	-	0,14
TOTAL	1,30	0,04	0,22	0,30	0,13	0,31
Autres composés : Tentative d'identification						
6-Methyl-5-heptène-2-one	-	-	-	-	-	-
Cis-3-Hexène-1-ol	-	-	-	-	-	-
Trans-3-Hexène-1-ol	-	-	-	-	-	-
2-hydroxy-1,8-Cinéole	0,21	-	-	-	-	-
Cis-Murol 5-en-4- α -ol	0,05	-	-	-	-	-
2,6 Dimethyl-3,7-Octadiène -2,6-diol	0,03	-	-	-	-	-
4-Allyl-2-methoxyphenol (t)	0,03	-	-	-	-	-
Tetracyclo (6,3,2,0 (2,5),0 (1,8))tridecan-9-ol	0,04	-	-	-	-	-
TOTAL	0,37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Rendement (ml/100g de MS)	10,11	9,98	10,32	10,45	10,25	10,31

D'après ce tableau, le rendement en huile en ml/100g de MS varie de 9,98 à 10,45. Le plus faible rendement (9,98) est observé au mois de juin, tandis que le plus élevé (10,45) est enregistré au mois d'octobre. Aucune variation importante de la teneur de chaque groupe de constituant n'est observée durant l'année :

- Hydrocarbures monoterpéniques : 20,21 % - 30,19 %.
- Produits oxygénés monoterpéniques : 69,89 % - 78,35 %.
- Hydrocarbures sesquiterpéniques : 0,08 % - 0,70 %.
- Produits oxygénés sesquiterpéniques : 0,04 % - 1,30 %.

Tableau 23: Evolution de la composition chimique pour le chémotype à néral et géraniol au cours de l'année (% relatif).

	Chémotype III (néral & géraniol)					
	avr-08	juin-08	août-08	oct-08	déc-08	févr-09
Hydrocarbures monoterpéniques						
α-Pinène	0,58	0,40	0,18	0,37	0,22	0,37
Camphène	0,03	0,02	-	-	-	-
β-Pinène	2,93	2,10	1,04	1,85	2,74	3,96
Sabinène	0,12	0,02	0,01	0,01	0,03	0,30
Myrcène	0,21	0,05	0,13	0,09	0,14	0,08
α-Terpinène	0,01	-	-	-	-	-
Limonène	0,53	0,31	0,19	0,11	0,63	0,41
β-Phellandrène	0,03	0,01	-	0,09	0,02	0,07
Trans-β-Ocymène	0,39	0,25	0,34	0,53	0,26	0,39
γ-Terpinène	0,02	0,01	0,01	-	-	-
Cis-β-Ocymène	0,34	0,34	0,26	0,40	0,22	0,28
p-Cymène	0,14	0,14	0,03	0,03	0,02	0,03
Terpinolène	0,04	0,02	0,02	0,02	-	0,01
TOTAL	5,37	3,67	2,20	3,49	4,29	5,90
Produits oxygénés monoterpéniques						
1,8 Cinéole	0,31	0,31	0,24	0,17	0,15	0,13
Oxyde de cis-linalol (furanoïde)	0,20	0,15	0,14	0,07	0,16	0,06
Oxyde de trans-linalol (furanoïde)	0,10	0,09	0,07	0,04	0,08	0,02
Citronellal	0,79	0,94	0,87	0,94	1,04	1,11
Linalol	0,72	1,55	0,82	0,63	0,48	0,44
Terpinène-4-ol	0,28	0,35	0,27	0,20	0,19	0,16
Hotriénol	-	-	-	-	-	-
Myrténal	0,11	0,08	0,07	0,03	0,04	0,01
Pinocarvéol	0,28	0,61	0,39	0,07	0,13	0,05
δ-Terpinéol	0,03	-	-	-	-	-
Néral	34,11	33,69	34,52	37,37	37,11	34,54
Acétate de terpenyle	0,04	0,12	-	-	-	-
α-Terpinéol	0,43	0,62	0,48	0,48	0,28	0,25
Géraniol	45,31	45,64	47,04	47,50	48,68	46,17
Oxyde de cis-linalol (pyranoïde)	0,06	0,28	-	0,15	0,12	0,09
Acétate de géranyle	1,17	1,76	1,74	0,58	1,09	2,03
Oxyde de Trans-linalol (pyranoïde)	-	0,12	-	-	-	0,16
Citronellol	0,95	1,15	0,83	0,72	0,76	0,91
Myrténol	0,11	0,26	0,15	0,03	0,13	0,09
Nérol	0,80	0,88	0,78	0,88	0,52	0,86
Géraniol	4,97	5,20	6,22	4,66	3,63	6,98
TOTAL	90,79	93,79	94,66	94,51	94,58	94,05
Hydrocarbures sesquiterpéniques						
α-Cubebène	0,07	0,01	0,02	0,01	0,01	0,03
α-Copaène	-	-	-	-	-	-
β-Caryophyllène	0,32	0,08	0,42	0,37	0,02	0,18
α-Humulène	0,13	0,07	0,12	0,06	0,02	0,08
β-Farnesène	0,20	0,53	0,32	0,18	0,22	0,28
δ-Cadinène	0,29	0,59	0,53	0,49	0,34	0,47
Calaménène	0,03	-	-	0,03	-	0,02
α-Calocarène	0,00	-	-	-	-	-
TOTAL	1,05	1,28	1,41	1,14	0,62	1,05

Suite tableau 23

Produits oxygénés sesquiterpéniques						
Oxyde de caryophyllène	1,19	2,14	1,61	0,46	1,54	1,22
Oxyde de humulène	0,33	0,47	0,41	0,00	0,19	0,29
Trans Nérolidol	-	-	-	-	-	-
Cadina-1,4-diol	-	-	-	-	-	-
Carotol	-	-	-	-	-	-
Cubénol	-	-	-	-	-	-
Viridiflorol	-	-	-	-	-	-
Elémol	-	-	-	-	-	-
α -Vétivone	-	-	-	-	-	-
β -Vétivone	-	0,01	0,02	-	-	-
γ -Eudésmol	0,06	0,01	0,07	-	-	0,01
δ -Cadinol	0,02	-	-	-	-	-
α -Eudésmol	0,06	-	-	-	-	-
β -Eudésmol	0,01	-	-	-	-	-
Acide citronellique	0,02	-	-	-	-	-
β -Phéllandral	0,01	-	-	-	-	-
Hydroxycarvotanacétone	0,11	0,13	0,21	0,01	0,02	0,05
Acide géranique	0,03	0,02	0,09	-	-	-
Intermedéol	0,20	0,20	0,15	0,04	0,07	0,03
Driménol	0,01	0,01	-	0,01	0,13	0,01
TOTAL	2,04	3,00	2,55	0,51	1,94	1,61
Autres composés : Tentative d'identification						
6-Methyl-5-heptène-2-one	0,42	0,41	0,46	0,56	0,49	0,34
Cis-3-Hexène-1-ol	0,02	0,05	0,03	0,01	0,01	-
Trans-3-Hexène-1-ol	0,03	0,02	0,06	0,03	0,12	0,07
2-hydroxy-1,8-Cinéole	0,19	0,24	0,44	0,24	0,73	0,47
Cis-Muurool 5-en-4- α -ol	-	-	-	-	-	-
2,6 Dimethyl-3,7-Octadiène -2,6-diol	-	-	-	-	-	-
4-Allyl-2-methoxyphenol (t)	0,03	-	-	-	-	-
Tetracyclo (6,3,2,0 (2,5),0 (1,8))tridecan-9-ol	0,06	0,10	0,07	0,02	0,02	0,03
TOTAL	0,28	0,33	0,51	0,26	0,75	0,51
Rendement (ml/100g de MS)	7,33	7,51	7,84	7,98	7,78	7,25

D'après ce tableau, le rendement en huile en ml/100g de MS varie de 7,25 à 7,98. Le plus faible rendement (7,25) est observé au mois de février, tandis que le plus élevé (7,98) est enregistré au mois d'octobre. Aucune variation importante de la teneur de chaque groupe de constituant n'est observée durant l'année :

- Hydrocarbures monoterpéniques : 2,20 % - 5,90 %.
- Produits oxygénés monoterpéniques : 90,79 % - 94,58 %.
- Hydrocarbures sesquiterpéniques : 0,62 % - 1,41 %.
- Produits oxygénés sesquiterpéniques : 0,51 % - 3,00 %.

Tableau 24: Evolution de la composition chimique pour le chémotype à acide gérannique au cours de l'année (% relatif).

	Chémotype IV (acide gérannique)					
	avr-08	juin-08	août-08	oct-08	déc-08	févr-09
Hydrocarbures monoterpéniques						
α-Pinène	0,93	0,59	1,26	1,27	1,14	0,52
Camphène	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
β-Pinène	3,70	2,34	3,59	4,86	4,17	4,44
Sabinène	0,21	0,26	0,24	0,23	0,07	0,17
Myrcène	0,69	0,41	0,41	0,43	0,45	0,31
α-Terpinène	0,04	0,10	0,12	0,04	-	-
Limonène	0,94	0,33	0,86	0,34	1,36	0,62
β-Phellandrène	0,14	0,08	0,16	0,29	0,18	0,13
Trans-β-Ocymène	1,23	1,06	1,17	1,99	1,95	1,90
γ-Terpinène	0,16	0,07	0,10	0,20	0,06	0,06
Cis-β-Ocymène	2,22	2,37	3,37	3,69	2,23	2,13
p-Cymène	0,18	0,08	0,07	0,17	0,15	0,07
Terpinolène	0,08	0,04	0,04	0,04	0,03	-
TOTAL	10,55	7,73	11,39	13,53	11,78	10,34
Produits oxygénés monoterpéniques						
1,8 Cinéole	2,36	2,82	3,68	3,63	2,11	1,57
Oxyde de cis-linalol (furanoïde)	0,14	0,05	0,14	0,03	0,06	0,06
Oxyde de trans-linalol (furanoïde)	0,11	0,02	0,08	0,01	-	-
Citronellal	0,22	0,09	0,11	0,16	0,21	0,48
Linalol	8,15	8,36	7,95	9,45	7,99	8,86
Terpinène-4-ol	0,94	-	-	-	-	-
Hotriénol	-	-	-	-	-	-
Myrténal	0,01	-	-	-	-	-
Pinocarvéol	0,03	-	-	-	-	-
δ-Terpinéol	0,02	0,05	0,04	0,01	-	-
Néral	6,61	8,39	6,09	5,47	7,03	8,01
Acétate de terpenyle	0,07	0,07	0,10	0,12	0,25	0,05
α-Terpinéol	1,14	0,48	0,89	0,63	0,61	0,28
Géranial	10,82	11,02	9,89	9,03	10,42	12,06
Oxyde de cis-linalol (pyranoïde)	0,02	-	-	-	-	-
Acétate de geranyle	0,23	0,66	0,80	0,57	0,65	0,31
Oxyde de Trans-linalol (pyranoïde)	0,08	-	-	-	-	-
Citronellol	0,55	0,39	0,46	0,41	0,41	0,31
Myrténol	0,06	-	-	-	-	-
Nérol	2,13	1,64	2,10	2,14	2,20	1,43
Géraninol	1,22	2,64	1,27	0,82	1,19	1,65
TOTAL	34,91	36,69	33,60	32,47	33,13	35,07
Hydrocarbures sesquiterpéniques						
α-Cubebène	0,13	0,06	0,09	0,05	0,15	0,05
α-Copaène	0,04	0,01	0,06	0,01	0,03	-
β-Caryophyllène	0,90	0,48	0,34	0,73	1,36	0,35
α-Humulène	0,42	0,96	0,50	0,65	0,60	0,10
β-Farnesène	0,12	0,05	0,30	0,16	0,07	0,06
δ-Cadinène	0,51	0,62	0,42	0,56	0,40	0,45
Calaménène	0,35	0,42	0,73	0,30	0,32	0,19
α-Calocarène	-	-	-	-	-	-
TOTAL	2,47	2,61	2,44	2,46	2,93	1,21

Suite tableau 24

Produits oxygénés sesquiterpéniques						
Oxyde de caryophyllène	1,10	0,96	1,54	0,81	0,98	0,82
Oxyde de humulène	0,31	0,30	0,55	0,23	0,24	0,23
Trans Nérolidol	0,03	0,07	0,09	0,04	0,04	0,06
Cadina-1,4-diol	0,19	0,21	0,23	0,22	0,22	0,19
Carotol	-	-	-	-	-	-
Cubénol	0,12	0,13	0,13	0,15	0,11	0,10
Viridiflorol	0,02	-	-	-	-	-
Elémol	-	-	-	-	-	-
α -Vétivone	-	-	-	-	-	-
β -Vétivone	0,05	0,15	0,02	0,01	0,01	0,00
δ -Eudésmol	0,04	-	-	-	-	-
δ -Cadinol	0,04	0,15	0,18	0,04	0,04	-
α -Eudésmol	0,04	0,02	0,01	-	0,03	0,03
β -Eudésmol	0,08	0,09	0,08	-	-	0,10
Acide citronellique	0,26	-	-	-	-	-
β -Phéllandral	-	-	-	-	-	-
Hydroxycarvotanacétone	-	-	-	-	-	-
Acide gérannique	48,11	48,77	48,04	49,46	48,13	50,32
Intermedéol	1,06	1,24	1,00	0,68	1,94	1,15
Driménol	0,02	0,14	0,11	-	0,13	0,07
TOTAL	51,46	52,23	51,96	51,63	51,88	53,08
Autres composés : Tentative d'identification						
6-Methyl-5-heptène-2-one	0,42	0,64	0,48	0,08	0,29	0,56
Cis-3-Hexène-1-ol	0,07	0,03	0,03	0,06	0,11	0,03
Trans-3-Hexène-1-ol	0,16	0,07	0,05	0,07	0,16	0,10
2-hydroxy-1,8-Cinéole	-	-	0,01	-	-	-
Cis-Murol 5-en-4- α -ol	0,07	0,03	0,08	0,05	0,05	0,04
2,6 Dimethyl-3,7-Octadiène -2,6-diol	-	-	-	-	-	-
4-Allyl-2-methoxyphenol (t)	0,28	0,02	0,04	0,04	0,01	0,01
Tetracyclo (6,3,2,0 (2,5),0 (1,8))tridecan-9-ol	0,09	0,08	0,09	0,06	0,05	0,05
TOTAL	0,44	0,13	0,22	0,15	0,10	0,09
Rendement (ml/100g de MS)	4,56	5,01	5,31	5,22	5,10	5,03

D'après ce tableau, le rendement en huile en ml/100g de MS varie de 4,56 à 5,31. Le plus faible rendement (4,56) est observé au mois d'avril, tandis que le plus élevé (5,31) est enregistré pour au d'août. Aucune variation importante de la teneur de chaque groupe de constituant n'est observée durant l'année :

- Hydrocarbures monoterpéniques : 7,73 % - 13,53 %.
- Produits oxygénés monoterpéniques : 32,47 % - 36,69 %.
- Hydrocarbures sesquiterpéniques : 1,21 % - 2,93 %.
- Produits oxygénés sesquiterpéniques : 51,46 % - 53,08 %.

1.6.2. Evolution des teneurs en constituants principaux de chaque chémotype de l'huile essentielle de *C. fragrans* au cours de l'année.

La figure 35 montre l'évolution de la teneur en linalol, en 1,8 cinéole, en néral, en géraniol et en acide gérannique au cours de l'année.

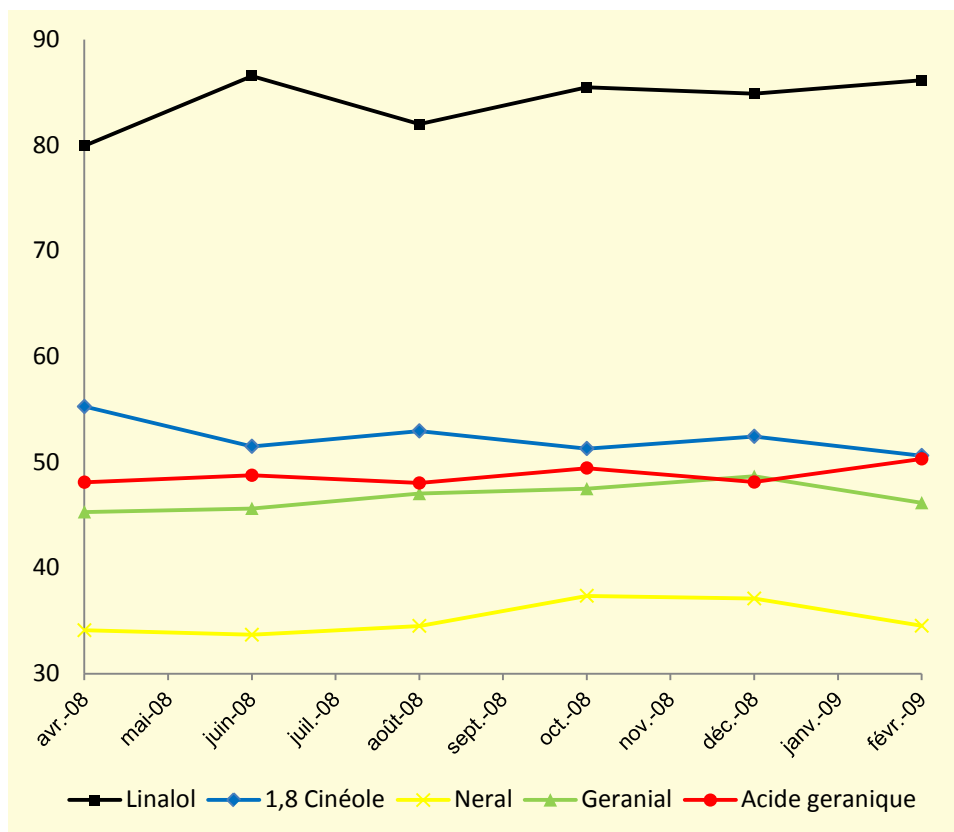


Figure 35: Evolution des teneurs en linalol, en 1,8 cinéole, en néral, en géraniol et en acide gérannique au cours de l'année.

La plus faible teneur en linalol (79,93 %) est observée au mois d'avril, tandis que la plus élevée (86,55 %) est enregistrée au mois de juin. La teneur en 1,8 cinéole est enregistrée entre 50,64 % (février) et 55,27 % (mois d'avril). La teneur en néral et géraniol évolue, respectivement, de 33,69 % (mois d'août) à 37,37 % (mois d'octobre) et de 45,31 % (mois d'avril) à 48,68 % (mois de décembre). La plus faible teneur en acide gérannique est observée au mois d'avril (48,11 %) tandis que la plus élevée (50,32 %) est enregistrée au mois de février (50,32 %) (Figure 35). Aucune variation importante des teneurs en constituants principaux de chaque chémotype n'est observée au cours de l'année.

En somme, les dates de récolte n'affectent pas, tant qualitativement que quantitativement, la composition chimique des huiles extraites. Tous les chémotypes pris en compte restent invariables au cours de l'année.

II. Huiles essentielles de *Cinnamosma madagascariensis*

II.1. Composition chimique des huiles essentielles de *C. madagascariensis*.

Le tableau 25 présente la composition chimique de l'huile essentielle de *C. madagascariensis*.

Tableau 25: Composition chimique de l'huile essentielle de *C. madagascariensis* (% relatif).

		<i>C. madagascariensis</i>		
Composants	IR	Min	Max	Moy ^a
Hydrocarbures monoterpéniques				
α-Pinène	1012	0,09	3,80	0,59
Camphène	1058	tr	0,14	0,01
β-Pinène	1107	0,31	15,36	1,86
Sabinène	1117	tr	1,35	0,27
Myrcène	1157	tr	0,83	0,15
α-Terpinène	1169	-	tr	tr
Limonène	1188	0,08	0,96	0,32
β-Phellandrène	1197	-	0,38	0,04
Trans-β-Ocymène	1224	-	-	-
γ-Terpinène	1233	-	0,11	0,01
Cis-β-Ocymène	1240	tr	0,01	tr
p-Cymène	1254	0,06	2,49	0,93
Terpinolène	1267	-	0,03	tr
TOTAL				4,16

Suite tableau 25

		<i>C. madagascariensis</i>		
Composants	IR	Min	Max	Moy ^a
Produits oxygénés monoterpéniques				
1,8 Cinéole	1200	0,40	46,18	16,94
Oxyde de cis-linalol (furanoïde)	1426	0,36	8,95	2,12
Oxyde de Trans-linalol (furanoïde)	1553	0,28	8,52	1,91
Citronéllal	1458	-	0,12	0,01
Linalol	1535	5,14	29,45	14,82
Terpinène-4-ol	1583	0,09	7,58	2,91
Hotriénol	1597	0,02	1,13	0,36
Myrténal	1600	0,01	4,34	1,12
Pinocarvéol	1636	0,12	6,20	1,71
δ-Terpinéol	1653	-	1,66	0,69
Néral	1649	0,10	1,52	0,41
Acétat de terpényl	1673	tr	3,23	0,73
α-Terpinéol	1659	tr	11,58	4,64
Géranial	1710	tr	5,35	0,41
Oxyde de cis-linalol (pyranoïde)	1724	0,02	1,39	0,32
Acétate de géranyle	1742	-	0,66	0,13
Oxyde de trans-linalol (pyranoïde)	1752	0,02	1,50	0,34
Citronéllol	1757	-	0,10	0,01
Myrténol	1777	tr	4,55	0,95
Nérol	1789	-	0,21	0,04
Géraniol	1839	tr	2,16	0,11
TOTAL				50,69
Hydrocarbures sesquiterpéniques				
α-Cubebène	1437	tr	0,23	0,03
α-Copaène	1468	-	1,60	0,30
β-Caryophyllène	1570	-	3,05	0,28
α-Humulène	1641	tr	0,77	0,16
β-Farnesène	1650	-	1,77	0,23
δ-Cadinène	1735	tr	0,92	0,12
Calaménène	1809	tr	6,09	1,43
α-Calocarène	1890	0,27	1,70	0,88
TOTAL				3,44

Suite tableau 25

Composants	IR	C. madagascariensis		
		Min	Max	Moy ^a
Produits oxygénés sesquiterpéniques				
Oxyde de Caryophyllène	1958	7,14	36,74	20,65
Oxyde de Humulène	2013	0,87	9,48	3,32
Trans Nérolidol	2032	0,00	2,78	0,63
Cadina-1,4-diol	2035	0,03	1,54	0,49
Carotol	2043	-	0,23	0,01
Cubénol	2045	0,29	2,69	0,91
Viridiflorol	2054	tr	0,31	0,03
Elémol	2064	tr	1,26	0,53
α-Vétivone	2089	-	1,40	0,52
β-Vétivone	2113	0,09	4,41	1,58
δ-Eudésmol	2140	0,10	1,83	0,65
δ-Cadinol	2161	0,07	1,70	0,64
α-Eudésmol	2174	tr	1,91	0,48
β-Eudésmol	2179	tr	4,73	1,31
Acide citronélique	2203	-	0,04	0,00
β-Phéllandral	2226	-	1,49	0,55
Hydroxycarvotanacétone	2231	-	2,02	1,03
Acide gérannique	2237	0,06	2,76	0,69
Intermedéol	2249	0,97	3,86	2,09
Driménol	2298	0,06	3,97	0,96
TOTAL				37,08
Tentative d'identification				
6-Methyl-5-heptène-2-one	1321	-	0,75	0,24
Cis-3-Hexène-1-ol	1370	0,03	0,89	0,23
Trans-3-Hexène-1-ol	1392	0,07	1,52	0,47
2-hydroxy-1,8-Cinéole	1844	-	0,01	tr
Cis-Muurool 5-en-4-alpha-ol	1871	-	0,10	0,03
2,6 Dimethyl-3,7-Octadiène -2,6-diol	1944	-	0,02	tr
4-Allyl-2-methoxyphenol (t)	2190	0,42	5,00	2,02
Tetracyclo (6,3,2,0 (2,5),0 (1,8))tridecan-9-ol	2214	0,25	3,98	1,44
TOTAL				4,43

IR: indices de rétention

^a: valeur moyenne (n = 20)

tr: trace (<0.01%)

- : non détecté (0.00 %)

L'analyse par CPG/SM des huiles essentielles de *C. madagascariensis* a permis de séparer 70 pics représentant les hydrocarbures monoterpéniques, les produits oxygénés monoterpéniques, les hydrocarbures sesquiterpéniques ainsi que les produits oxygénés sesquiterpéniques (Tableau 25):

- les hydrocarbures monoterpéniques représentent 4,16 % de la composition chimique totale de l'huile essentielle de *C. madagascariensis* : le β -pinène (1,86 %) est le constituant majoritaire monoterpénique ;
- les produits oxygénés monoterpéniques représentent 50,94 % de la composition chimique totale de l'huile essentielle de *C. madagascariensis* : le 1,8 cinéole (16,94 %) et le linalol (15,07 %) sont les constituants majoritaires ;
- les hydrocarbures sesquiterpéniques représentent 3,69 % de la composition chimique totale de l'huile essentielle de *C. madagascariensis* : avec une teneur moyenne de 1,43 %, le calaménène est le constituant majoritaire sesquiterpénique;
- les produits oxygénés sesquiterpéniques représentent 34,53 % de la composition chimique totale de l'huile essentielle de *C. madagascariensis* : le principal produit oxygéné sesquiterpénique est l'oxyde de caryophyllène avec une teneur moyenne de 20,15 %.

Pour mettre en évidence la variabilité chimique des huiles essentielles de *C. madagascariensis* des analyses statistiques ont été effectuées.

II.2. Analyse en Composantes Principales (*C. madagascariensis*)

Dans cette analyse en composantes principales, les individus sont représentés par les 20 échantillons d'huiles issus de 20 arbres et les variables par les 12 constituants représentant une teneur ≥ 5 % dans au moins un échantillon (Annexe 18 : matrice de données).

II.2.1. Test de sphéricité de Bartlett (C. madagascariensis)

Le tableau 26 montre le test de sphéricité de Bartlett.

Tableau 26: Test de sphéricité de Bartlett (C. madagascariensis)

Khi ² (Valeur observée)	205,40
Khi ² (Valeur critique)	99,62
DDL	78
p-value	< 0,0001
alpha	0,05

D'après ce test, la valeur critique de Khi² est largement inférieure à Khi² observée au seuil $\alpha = 0,05$. En effet, on peut rejeter l'hypothèse nulle H_0 d'absence de corrélation significative entre les variables et retenir l'hypothèse alternative H_a (au moins l'une des corrélations entre les variables est significativement différente de 0).

II.2.2. Valeurs propres en ACP (C. madagascariensis)

Les valeurs propres des axes principaux (variance sur les axes principaux), le pourcentage des informations et le pourcentage cumulé des informations sont exposés dans le tableau 27.

Tableau 27 : Valeurs propres des axes principaux en ACP (C. madagascariensis)

	F1	F2	F3
Valeur propre	5,40	1,65	1,59
Variabilité (%)	45,03	13,78	13,28
% cumulé	45,03	58,81	72,09

La première composante principale (F1) explique 45,03 % de l'information totale. La deuxième composante principale (F2) montre 13,78 %. La combinaison linéaire des deux premières composantes principales (58,81 %) est déjà représentative des variables car leur pourcentage cumulé est supérieur à 50 %. Les 3 premières composantes principales expliquent 72,09 % de l'information totale ce qui est bien élevé pour représenter les variables.

II.2.3. Caractérisation des variables et des individus en ACP (*C. madagascariensis*)

La figure 36 représente le plan formé par les axes F1 et F2 montrant la corrélation entre les variables.

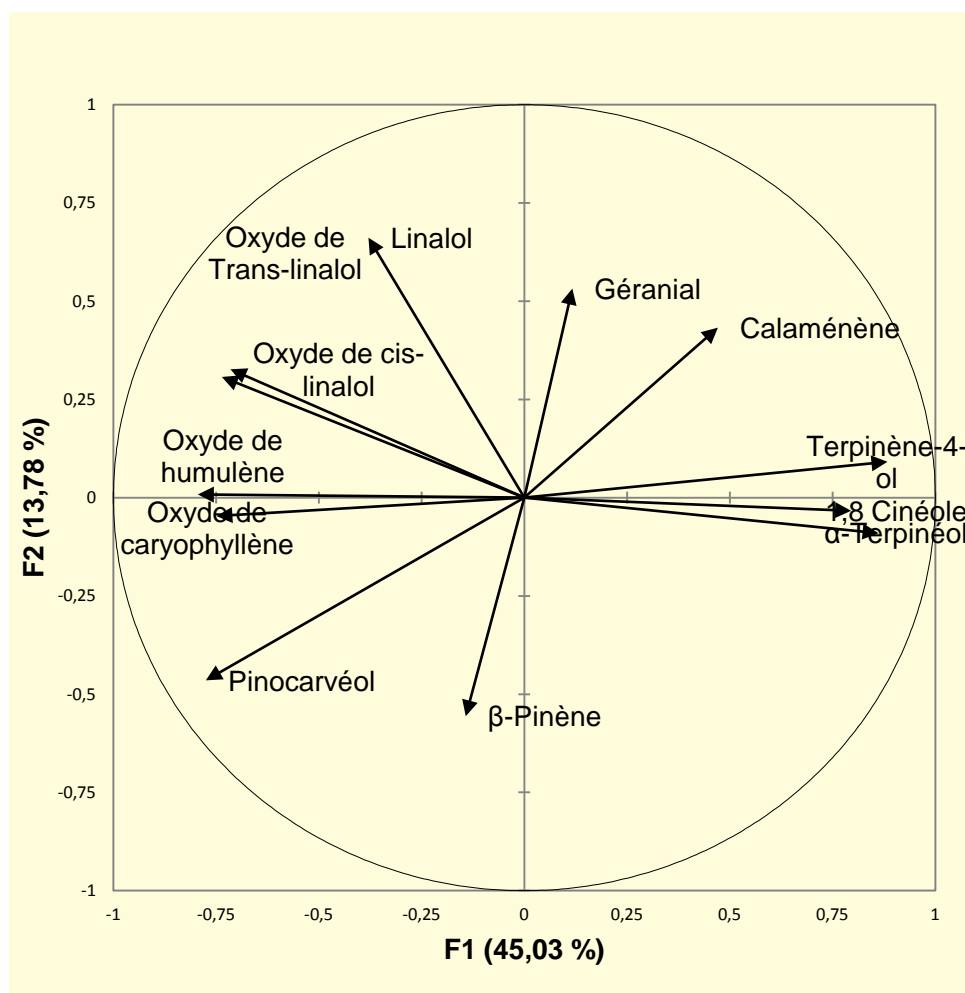


Figure 36: Cercle de corrélation des variables dans l'ACP (*C. madagascariensis*)

L'axe F1 est formé par deux corrélations des variables : la corrélation négative entre l'oxyde de caryophyllène (0,75) et l'oxyde de humulène (0,80) et la corrélation positive entre l'α-terpinéol (0,68), le 1,8-cinéole (0,80) et le terpinène 4-ol (0,88) (Figure 36).

La figure 37 montre répartition des 20 individus de *C. madagascariensis* en deux groupes.

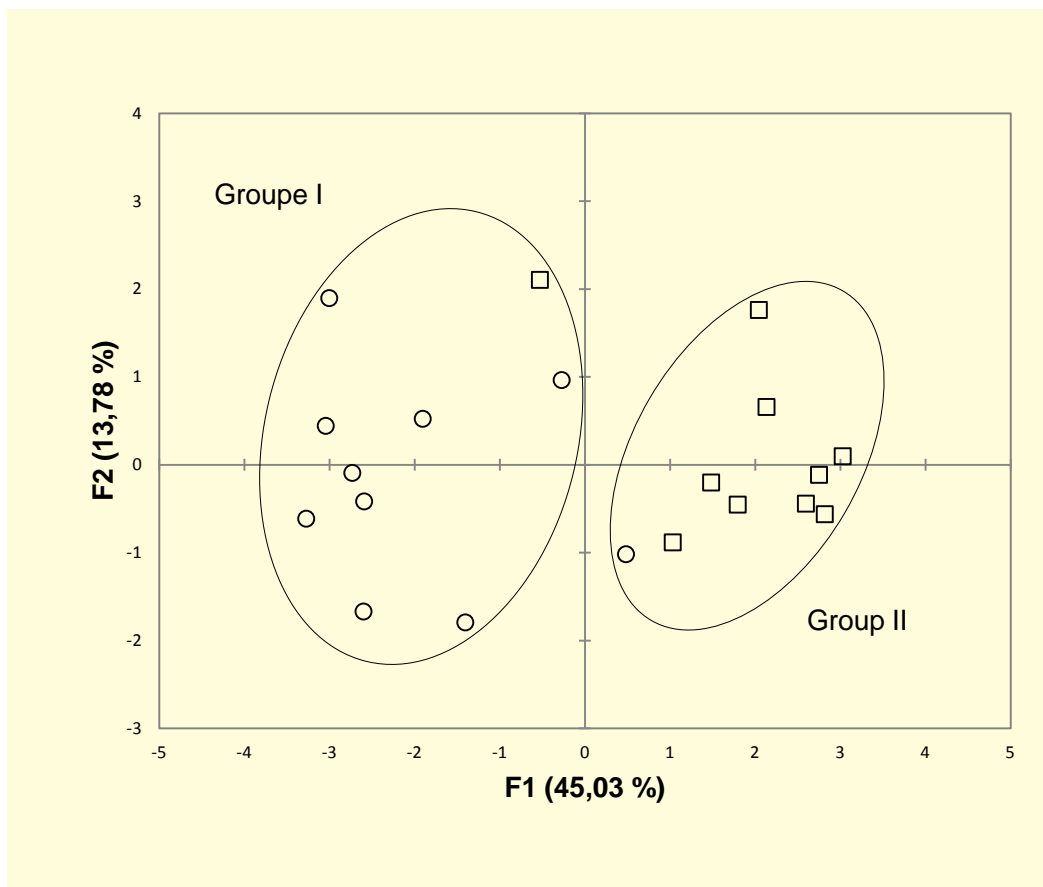


Figure 37: Répartition des 20 individus de *C. madagascariensis* en deux groupes

(Rond représente les échantillons d'Ambohitantely et carré ceux de Tampolo)

Cette figure montre que les 20 individus de *C. madagascariensis* sont repartis en deux groupes :

- le groupe I rassemble 09 individus provenant d'Ambohitantely et un individu provenant de Tampolo dont les huiles sont riches en oxyde de caryophyllène (26,60 %) ;
- le groupe II est caractérisé par la forte teneur en 1,8 cinéole (30,89 %) et est constitué par 10 individus dont 09 collectés à Tampolo et un collecté à Ambohitantely.

Cette répartition des 20 individus de *C. madagascariensis* par l'ACP sera confirmée par la CAH et par l'AFD.

II.3. Classification Ascendante Hiérarchique (*C. madagascariensis*)

La classification des 20 individus de *C. madagascariensis* (Figure 38) a donné deux classes dont:

- la classe 1 (C1) regroupe 10 individus dont 09 provenant de Tampolo (TPL 01 à TPL 07, TPL 09 et TPL 10) et un provenant d'Ambohitantely (CAM 08) correspondant au groupe II de l'ACP;
- la classe 2 (C2) est composée de 09 individus provenant d'Ambohitantely (CAM 01 à CAM 07, CAM 09 et CAM 10) et un provenant de Tampolo (TPL 08) correspondant au groupe I de l'ACP.

La figure 38 montre le dendrogramme de la classification des 20 individus de *C. madagascariensis*.

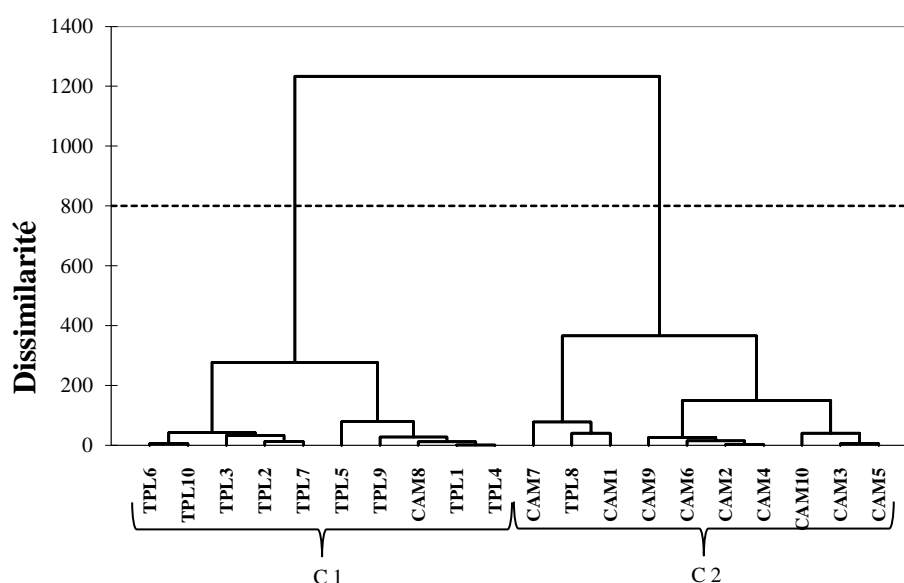


Figure 38: Dendrogramme de la classification des 20 individus de *C. madagascariensis*.

II.4. Analyse Factorielle Discriminante (*C. madagascariensis*)

II.4.1. Test de Lambda de Wilks *C. madagascariensis*

Le test de Lambda de Wilks (Tableau 28) est un test préliminaire dans la méthode AFD.

*Tableau 28: Test de Lambda de Wilks (*C. madagascariensis*)*

Lambda	0,017
F (Valeur observée)	34,44
F (Valeur critique)	3,58
DDL1	12
DDL2	7
p-value	< 0,0001
alpha	0,05

L'ACP a mis en exergue deux groupes d'individus bien distincts. D'après ce test de Lambda de Wilks, au seuil de signification alpha de 0,05, on peut rejeter l'hypothèse nulle (H_0) d'égalité des vecteurs espérances des deux groupes et garder l'hypothèse alternative H_a (au moins l'un des vecteurs moyens est différent d'un autre). La valeur de F critique est inférieure à la valeur de F observée. La différence entre les barycentres des groupes est significative.

II.4.2. Valeurs propres en AFD (*C. madagascariensis*)

La valeur propre et le pourcentage de l'axe principal sont indiqués dans le tableau 29 suivant:

*Tableau 29: Valeurs propres et pourcentage de variance en AFD (*C. madagascariensis*)*

	F1
Valeur propre	59,03
Discrimination (%)	100
% cumulé	100

L'axe unique F1 comporte à lui seul la totalité des informations (100 %).

II.4.3. Description des groupes (*C. madagascariensis*)

Le tableau 30 suivant montre la fréquence des deux groupes formés.

Tableau 30 : Effectifs des groupes formés (*C. madagascariensis*)

Classe	Effectifs	%
1	10	50,000
2	10	50,000

Les 20 échantillons sont bien répartis dans leur groupe d'appartenance.

II.4.4. Caractérisation des groupes (*C. madagascariensis*)

Le traitement par l'AFD a permis de constater que les 20 échantillons sont tous bien classés (à 100 %) dans les deux groupes préétablis lors de l'ACP. La figure 39 montre la représentation graphique des variables en AFD.

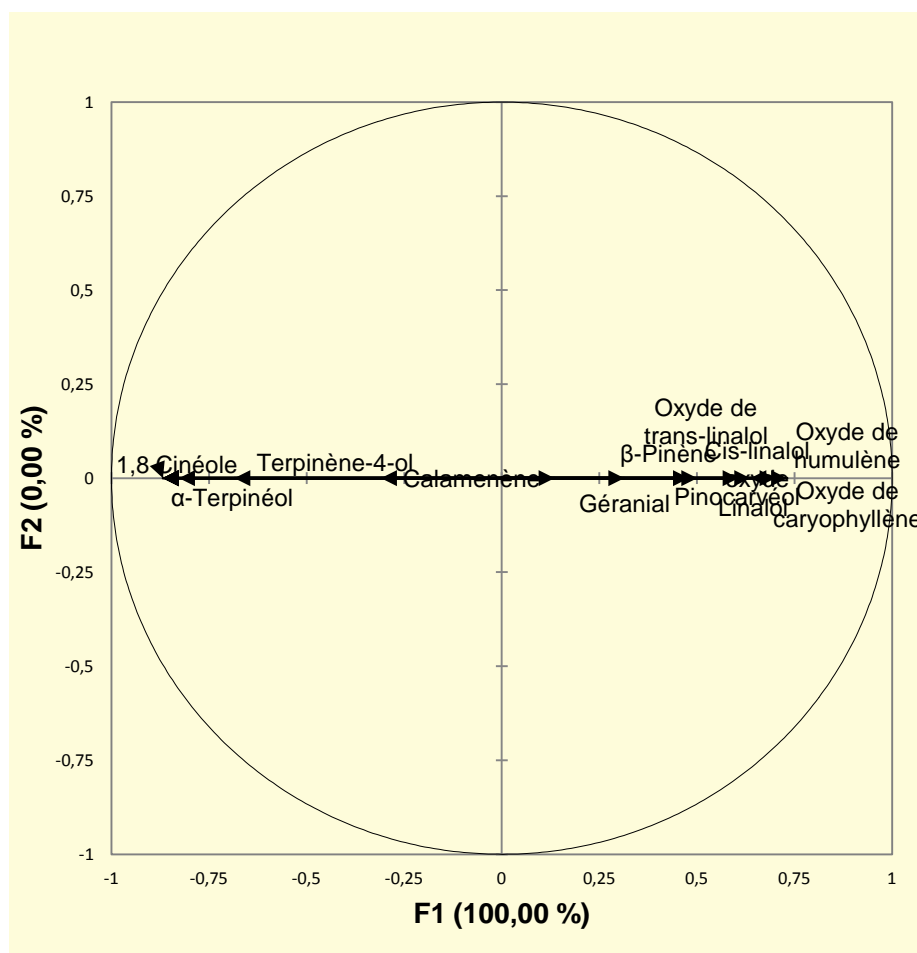


Figure 39: Représentation graphique des variables en AFD pour *C. madagascariensis*

La représentation graphique des individus en AFD est montréé sur la figure 40.

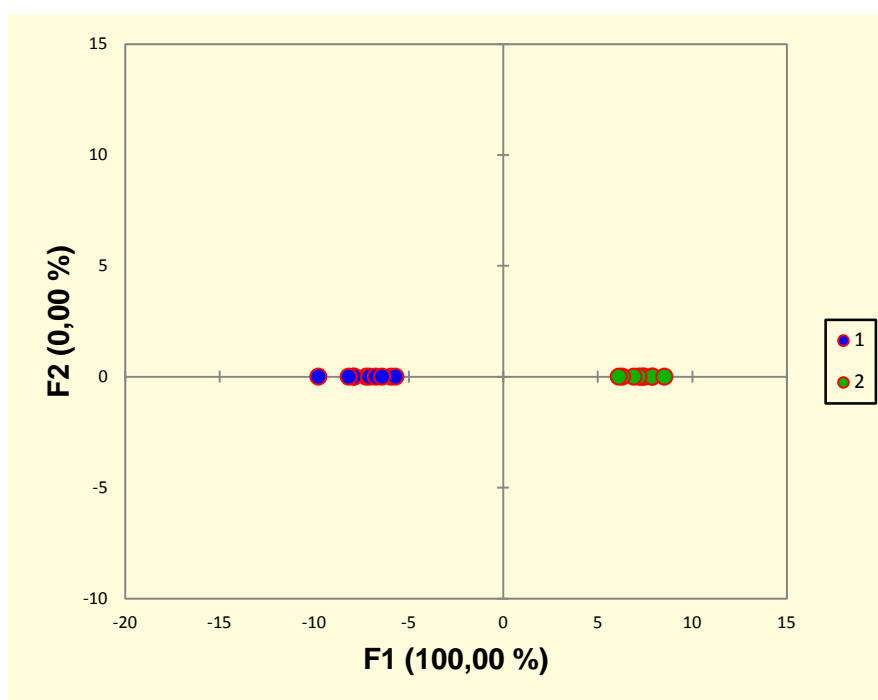


Figure 40: Représentation graphique des individus en AFD pour *C. madagascariensis*

La figure 41 représente les constituants chimiques des groupes formés en AFD.

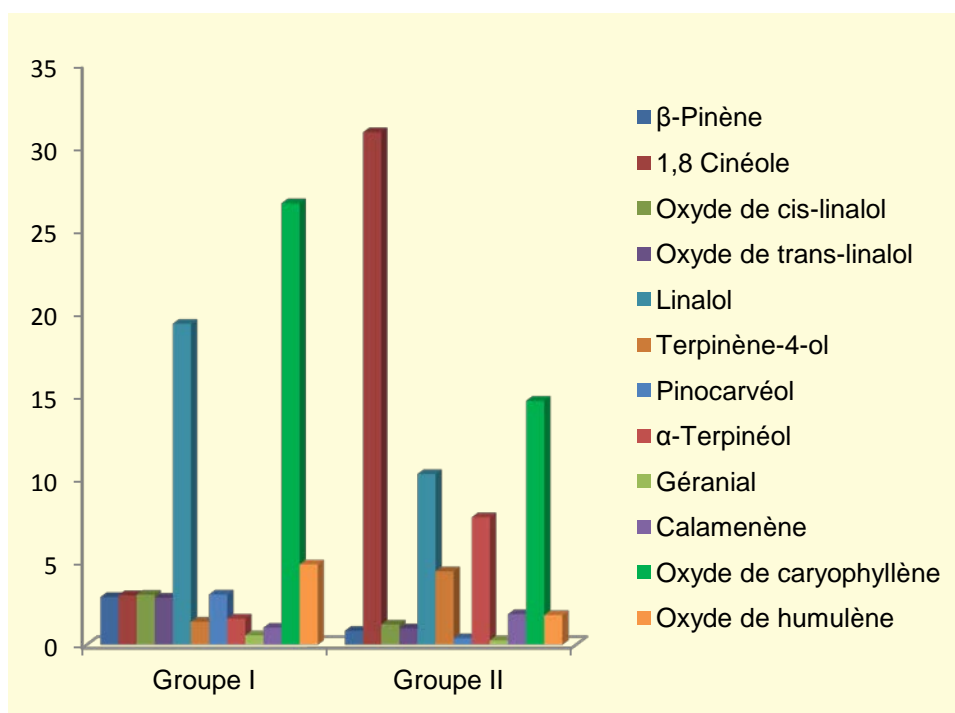


Figure 41: Comparaison des groupes de constituants chimiques des huiles essentielles de *C. madagascariensis*

Les figures 40, 41 montrent l'existence de deux groupes chimiques pour les huiles essentielles de *C. madagascariensis*: le groupe I est caractérisé par la forte teneur en oxyde de caryophyllène (26,60 %) et le groupe II est distingué par une teneur élevée en 1,8 cinéole (30,89 %).

En résumé, la répartition des groupes chimiques n'est pas influencée par la zone de collecte. La présence des échantillons de Tampolo et d'Ambohitantely dans chaque groupe identifié, confirme cette observation.

Comme les huiles essentielles de *C. fragrans*, nous avons attribué aussi le terme chémotype pour chaque groupe de l'huile essentielle de *C. madagascariensis* :

- le chémotype I à 1,8 cinéole pour le groupe II ;
- le chémotype II à oxyde de caryophyllène pour le groupe I.

II.5. Caractérisation chimique de chaque chémotype de l'huile essentielle de *C. madagascariensis*

Dans cette partie, nous allons spécifier d'une manière exhaustive les propriétés organoleptiques et physico – chimiques de chaque chémotype de l'huile essentielle de *C. madagascariensis*.

II.5.1. Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles de *C. madagascariensis*

Le tableau 31 présente les caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles de *C. madagascariensis*.

*Tableau 31: Caractéristiques organoleptiques de chaque chémotype de l' l'huile essentielle de *C. madagascariensis*.*

	Chémotype	
	I	II
Aspect	liquide mobile, limpide	
Odeur	riche et agréable, fortement aromatique	
Couleur	incolore	blanchâtre

La différence de couleur entre les chémotypes laisse supposer des aspects de variabilité qualitative entre les huiles essentielles de *C. madagascariensis*.

II.5.2. Evaluation du rendement en huile essentielle de *C. madagascariensis*

Après détermination de l'humidité et de la matière sèche, les échantillons préalablement pesés sont soumis à l'hydrodistillation pour donner des huiles essentielles, recueillies et mesurées afin d'obtenir des rendements qui sont exprimés en ml par 100 g de matière sèche.

Le tableau 32 présente les variations des teneurs en huiles essentielles de *C. madagascariensis*

*Tableau 32: Rendement en huile essentielle de *C. madagascariensis**

Chémotype	Rendement (ml par 100 g de M.S.)		
	Min	Max	Moy
I	1,25	3,54	2,23
II	0,54	2,84	1,35

D'après le tableau 31, le chémotype I présente un rendement moyen élevé, de l'ordre de 2,23 %, tandis que chémotype II donne un rendement faible de l'ordre de 1,35 %.

II.5.3. Caractéristiques physico – chimiques des huiles essentielles de *C. madagascariensis*

Le tableau 33 montre les caractéristiques physico – chimiques de chaque chémotype de l'huile essentielle de *C. madagascariensis*.

*Tableau 33: Caractéristiques physico – chimiques des huiles essentielles de *C. madagascariensis**

Chémotype	Densité relative			Indice de réfraction		
	Min	Max	Moy	Min	Max	Moy
I	-	-	-	1,4657	1,4789	1,4562
II	-	-	-	1,4589	1,4752	1,4699

D'après ce tableau l'indice de réfraction entre les chémotypes varie de 1,4562 à 1,4699.

II.6. Influence de la date de récolte pour chaque chémotype identifié (*C. madagascariensis*)

Une fois vérifié que la zone de collecte n'est pas responsable de manière significative, la classification par chémotypes, nous allons évaluer l'incidence de la date de récolte sur la composition chimique des huiles essentielles à des dates déterminées dans l'année (d'avril 2008 à février 2009). Deux arbres, de chémotype connu, ont été choisis et soumis aux prélèvements réguliers.

II.6.1 Evolution de la composition chimique de chaque chémotype pour l'huile essentielle de *C. madagascariensis* durant l'année

Les tableaux 34 et 35 montrent l'évolution de la composition chimique de chaque chémotype au cours de l'année.

Tableau 34 : Evolution de la composition chimique pour le chémotype à caryophyllène oxyde au cours de l'année (% relatif).

Hydrocarbures monoterpéniques	Chémotype II (Oxyde de caryophyllène)					
	avr-08	juin-08	août-08	oct-08	déc-08	févr-09
α-Pinène	0,28	0,38	0,53	0,55	-	-
Camphène	0,30	0,64	0,17	0,25	-	-
β-Pinène	0,91	0,90	0,58	0,81	-	-
Sabinène	0,06	0,01	0,15	0,31	-	-
Myrcène	0,42	0,31	0,65	0,37	-	-
α-Terpinène	0,00	0,00	0,00	0,02	-	-
Limonène	0,10	0,19	0,14	0,28	-	-
β-Phellandrène	0,00	0,01	0,06	0,05	-	-
Trans-β-Ocymène	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-
γ-Terpinène	0,00	0,00	0,01	0,05	-	-
Cis-β-Ocymène	0,00	0,00	0,01	0,06	-	-
p-Cymène	0,32	0,23	0,42	0,59	-	-
Terpinolène	0,00	0,00	0,00	0,02	-	-
TOTAL	2,40	2,66	2,73	3,33	-	-
Produits oxygénés monoterpéniques						
1,8 Cinéole	1,48	2,41	1,80	2,34	-	-
Oxyde de cis-linalol (furanoïde)	3,33	1,87	1,42	1,53	-	-
Oxyde de trans-linalol (furanoïde)	3,15	1,82	1,24	1,30	-	-
Citronellal	0,01	0,04	0,02	0,03	-	-
Linalol	9,61	10,31	10,04	10,25	-	-
Terpinène-4-ol	0,66	0,95	0,92	0,94	-	-
Hotriénol	0,05	0,23	0,25	0,24	-	-
Myrténal	2,68	2,93	3,88	3,47	-	-
Pinocarvéol	5,75	5,76	5,15	6,20	-	-
δ-Terpinéol	0,03	0,00	0,00	0,00	-	-
Néral	1,42	1,42	1,37	1,73	-	-
Acétate de terpényle	1,03	1,23	1,74	1,04	-	-
α-Terpinéol	1,82	1,28	1,43	1,47	-	-
Géranial	0,03	0,72	0,66	0,50	-	-
Oxyde de cis-linalol (pyranoïde)	0,58	0,37	0,27	0,21	-	-
Acétate de géranyle	0,02	0,13	0,00	0,00	-	-
Oxyde de trans-linalol (pyranoïde)	0,72	0,38	0,37	0,29	-	-
Citronellol	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-
Myrténol	2,11	2,37	2,27	1,67	-	-
Nérol	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-
Géraniol	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-
TOTAL	34,51	34,21	32,82	33,22	-	-
Hydrocarbures sesquiterpéniques						
α-Cubébène	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-
α-Copaène	0,45	0,25	0,70	0,23	-	-
β-Caryophyllène	0,19	0,25	0,46	1,25	-	-
α-Humulène	0,02	0,32	0,65	0,54	-	-
β-Farenesène	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-
δ-Cadinène	0,75	0,49	0,74	0,32	-	-
Calaménène	0,44	0,55	0,49	0,38	-	-
α-Calocarène	1,20	1,58	1,22	1,25	-	-
TOTAL	3,05	3,44	4,26	3,96	-	-

Suite tableau 34

Produits oxygénés monoterpéniques						
Oxyde de caryophyllène	32,86	32,61	33,16	32,71	-	-
Oxyde de humulène	5,31	5,86	6,67	6,60	-	-
Trans Nérolidol	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-
Cadina-1,4-diol	0,33	0,24	0,42	0,28	-	-
Carotol	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-
Cubénol	0,46	0,56	0,41	0,59	-	-
Viridiflorol	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-
Elémol	0,27	0,31	0,37	0,30	-	-
α -Vétivone	0,63	1,02	0,89	1,08	-	-
β -Vétivone	2,73	2,01	2,06	2,02	-	-
δ -Eudésmol	1,20	1,17	1,29	1,17	-	-
δ -Cadinol	0,23	0,22	0,22	0,16	-	-
α -Eudésmol	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-
β -Eudésmol	2,45	2,33	2,43	2,36	-	-
Acide citronellique	0,02	0,04	0,04	0,05	-	-
β -Phéllandralle	0,63	0,27	0,10	0,12	-	-
Hydroxycarvotanacétone	1,09	0,93	1,80	2,11	-	-
Acide géranique	1,43	1,23	0,39	0,45	-	-
Intermedéol	3,13	3,42	2,56	2,83	-	-
Driménol	0,13	0,08	0,13	0,13	-	-
TOTAL	52,90	52,29	52,93	52,94	-	-
Autres composés : Tentative d'identification						
6-Methyl-5-heptène-2-one	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-
Cis-3-Hexène-1-ol	0,05	0,02	0,13	0,05	-	-
Trans-3-Hexène-1-ol	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-
2-hydroxy-1,8-Cinéole	0,06	0,00	0,00	0,00	-	-
Cis-Murol 5-en-4- α -ol	0,29	0,21	0,17	0,17	-	-
2,6 Dimethyl-3,7-Octadiène -2,6-diol	0,66	0,26	0,11	0,17	-	-
4-Allyl-2-methoxyphenol (t)	4,27	4,93	4,36	3,72	-	-
Tetracyclo (6,3,2,0 (2,5),0 (1,8))tridecan-9-ol	1,81	1,98	2,49	2,44	-	-
TOTAL	7,14	7,40	7,26	6,55	-	-
Rendement (ml/100g de MS)	2,1	1,93	2,02	1,98	-	-

D'après ce tableau, le rendement en huile en ml/100g de MS varie de 1,93 à 2,02. Le plus faible rendement (1,93) est observé au mois de juin, tandis que le plus élevé (2,02) est enregistré au mois d'août. Aucune variation importante de la teneur de chaque groupe de constituant n'est observée durant l'année :

- Hydrocarbures monoterpéniques : 2,40 % - 3,33 %.
- Produits oxygénés monoterpéniques : 32,82 % - 34,51 %.
- Hydrocarbures sesquiterpéniques : 3,05 % - 4,26 %.
- Produits oxygénés sesquiterpéniques : 52,29 % - 52,94 %.

Tableau 35: Evolution de la composition chimique pour le chémotype à 1,8 cinéole au cours l'année (% relatif).

Hydrocarbures monoterpéniques	Chémotype I (1,8 cinéole)					
	avr-08	juin-08	août-08	oct-08	déc-08	févr-09
α-Pinène	0,31	0,23	0,25	0,17	0,68	0,73
Camphène	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00
β-Pinène	0,65	0,44	0,32	1,29	0,57	0,61
Sabinène	0,22	0,34	0,31	0,83	0,30	0,26
Myrcène	0,02	0,01	0,00	0,03	0,39	0,33
α-Terpinène	0,00	0,00	0,21	0,00	0,00	0,00
Limonène	0,44	0,21	0,01	0,65	0,18	1,23
β-Phellandréne	0,04	0,04	0,00	0,01	0,02	0,00
Trans-β-Ocymène	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
γ-Terpinène	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Cis-β-Ocymène	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
p-Cymène	1,72	1,37	0,93	0,60	0,89	0,65
Terpinolène	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TOTAL	3,42	2,63	2,03	3,58	3,05	3,82
Produits oxygénés monoterpéniques						
1,8 Cinéole	35,10	35,87	35,35	35,15	35,78	35,92
Oxyde de cis-linalol (furanoïde)	1,39	1,58	1,33	0,20	0,11	0,09
Oxyde de trans-linalol (furanoïde)	1,11	1,28	1,11	0,09	0,00	0,02
Citronellal	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Linalol	9,92	11,62	11,66	14,57	11,69	11,47
Terpinène-4-ol	4,65	4,04	4,54	4,67	6,32	6,94
Hotriénol	0,23	0,15	0,33	0,26	0,22	0,22
Myrténal	0,40	0,27	0,17	0,00	0,00	0,00
Pinocarvéol	0,38	0,30	0,18	0,06	0,01	0,01
δ-Terpinéol	1,23	1,34	1,41	1,64	4,15	2,32
Néral	0,23	0,13	0,13	0,02	0,14	0,43
Acétate de terpényle	0,52	0,44	0,99	0,77	0,80	0,32
α-Terpinéol	8,46	8,46	7,75	9,02	8,16	9,87
Géranial	0,12	0,16	0,34	0,03	0,19	0,09
Oxyde de cis-linalol (pyranoïde)	0,14	0,26	0,39	0,11	0,03	0,04
Acétate de géranyle	0,18	0,08	0,41	0,04	0,00	0,00
Oxyde de trans-linalol (pyranoïde)	0,11	0,15	0,41	0,00	0,00	0,00
Citronellol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Myrténol	0,21	0,19	0,12	0,01	0,00	0,00
Nérol	0,09	0,11	0,09	0,00	0,00	0,00
Géranol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TOTAL	64,45	66,43	66,70	66,64	67,61	67,75
Hydrocarbures sesquiterpéniques						
α-Cubébène	0,03	0,01	0,00	0,32	0,10	0,29
α-Copaène	0,33	0,15	0,09	0,48	0,50	0,36
β-Caryophyllène	0,08	0,54	0,51	0,49	0,68	0,86
α-Humulène	0,04	0,03	0,00	0,02	0,39	0,49
β-Farnesène	0,15	0,00	0,00	0,11	0,00	0,00
δ-Cadinène	0,06	0,11	0,00	0,24	0,54	0,19
Calaménène	2,16	2,02	1,89	1,58	1,63	1,31
α-Calocarène	0,61	0,73	0,79	0,04	0,04	0,00
TOTAL	3,47	3,58	3,29	3,28	3,88	3,50

Suite tableau 35

Produits oxygénés monoterpéniques						
Oxyde de caryophyllène	11,85	12,23	11,15	11,06	11,50	11,86
Oxyde de humulène	1,33	1,41	1,04	0,54	0,36	0,21
Trans Nérolidol	1,12	0,24	0,90	0,91	0,41	0,38
Cadina-1,4-diol	0,68	0,78	0,55	0,87	2,07	1,51
Carotol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Cubénol	1,29	1,13	1,49	1,27	1,73	1,26
Viridiflorol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Elémol	0,99	0,87	1,00	1,20	0,21	0,40
α -Vétivone	0,13	0,08	0,29	0,04	0,06	0,03
β -Vétivone	0,72	0,61	0,56	0,53	0,49	0,23
δ -Eudésmol	0,25	0,31	0,20	0,18	0,17	0,06
δ -Cadinol	1,00	1,14	0,65	0,34	0,25	1,17
α -Eudésmol	0,59	0,68	0,59	0,05	0,03	0,31
β -Eudésmol	0,78	0,69	0,27	0,54	0,47	0,32
Acide citronellique	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
β -Phéllandralle	0,66	0,07	1,06	1,06	1,05	1,03
Hydroxycarvotanacétone	0,95	0,75	1,28	1,32	1,27	1,15
Acide géranique	0,79	0,49	1,22	1,09	1,09	1,03
Intermedéol	1,54	1,51	1,56	1,56	1,51	1,25
Driménol	1,09	1,46	1,35	1,92	1,25	1,39
TOTAL	25,74	24,46	25,16	24,49	23,91	23,60
Autres composés : Tentative d'identification						
6-Methyl-5-heptène-2-one	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Cis-3-Hexène-1-ol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Trans-3-Hexène-1-ol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2-hydroxy-1,8-Cinéole	0,53	0,58	0,57	0,71	0,40	0,69
Cis-Muurool 5-en-4- α -ol	0,07	0,25	0,24	0,30	0,15	0,11
2,6 Dimethyl-3,7-Octadiène -2,6-diol	0,48	0,60	0,57	0,00	0,00	0,00
4-Allyl-2-methoxyphenol (t)	1,24	1,00	1,13	0,48	0,51	0,29
Tetracyclo (6,3,2,0 (2,5),0 (1,8))tridecan-9-ol	0,59	0,48	0,36	0,53	0,49	0,24
TOTAL	2,92	2,91	2,82	2,01	1,56	1,34
Rendement (ml/100g de MS)	0,31	0,75	0,79	0,83	0,46	0,52

D'après ce tableau le rendement en huile en ml/100g de MS varie de 0,31 à 0,83. Le plus faible rendement (0,31) est observé au mois d'avril, tandis que le plus élevé (0,83) est enregistré au mois d'octobre. Aucune variation importante de la teneur de chaque groupe de constituant n'est observée durant l'année :

- Hydrocarbures monoterpéniques : 2,03 % - 3,82 %.
- Produits oxygénés monoterpéniques : 64,45 % - 67,75 %.
- Hydrocarbures sesquiterpéniques : 3,28 % - 3,88 %.
- Produits oxygénés sesquiterpéniques : 23,6 % - 25,74 %.

II.6.2. Evolution des teneurs en constituants principaux de chaque chémotype pour l'huile essentielle de *C. madagascariensis* au cours de l'année.

La figure 42 montre l'évolution de la teneur en oxyde de caryophyllène et en 1,8 cinéole au cours de l'année.

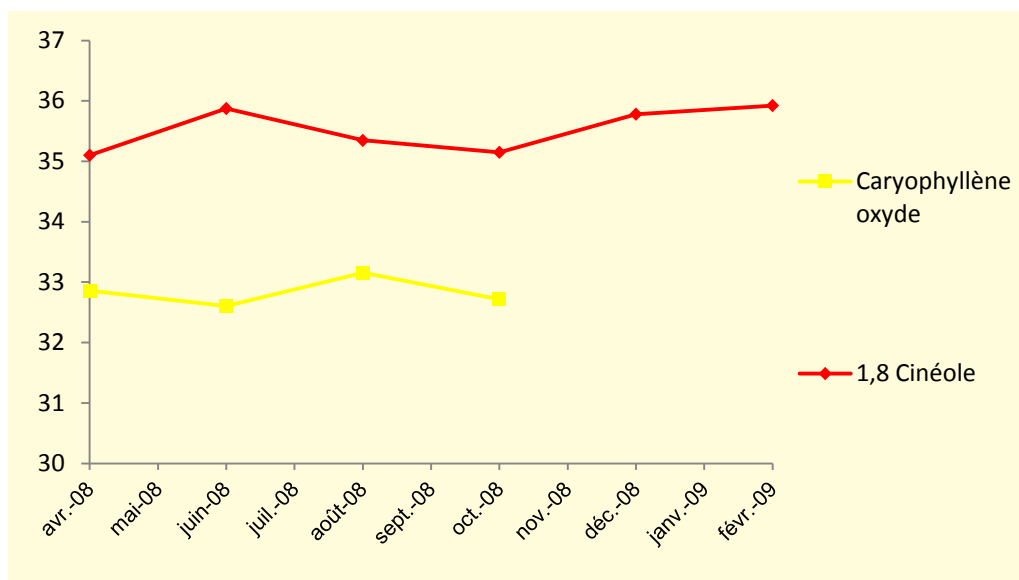


Figure 42: Evolution des teneurs en caryophyllène oxyde et en 1,8 cinéole durant l'année.

La plus faible teneur en oxyde de caryophyllène (32,61 %) est observée au mois de juin, tandis que la plus élevée (33,16 %) est enregistrée pour au d'août. La plus faible teneur en 1,8 cinéole est observée au mois d'avril (35,10 %) tandis que la plus élevée (35,92 %) est enregistrée au mois de février (Figure 42). Aucune variation importante des teneurs en constituants principaux de chaque chémotype n'est observée au cours de l'année.

En somme, les dates de récolte n'affectent pas, tant qualitativement que quantitativement, la composition chimique des huiles extraites. Les deux chémotypes pris en compte restent invariables au cours de l'année.

III. Comparaison de la composition chimique des huiles essentielles de *C. fragrans* et *C. madagascariensis*

Après avoir montré que la zone et les dates de collecte ne sont pas susceptibles de perturber la composition chimique de *C. fragrans* et *C. madagascariensis*, nous allons déterminer s'il y a similarité et/ou différence entre la composition chimique de l'huile essentielle de *C. fragrans* et *C. madagascariensis* en vue d'une exploitation en chimio taxonomie. En effet des analyses statistiques ont été réalisées avec les 47 échantillons (27 échantillons *C. fragrans* et 20 échantillons *C. madagascariensis*) et 16 variables représentant une teneur $\geq 5\%$ dans au moins un échantillon (Annexe 19 : matrice de données).

III.1. Analyse en Composantes Principales (*Cinnamosma* spp.)

III.1.1. Test de sphéricité de Bartlett (*Cinnamosma* spp.)

Le tableau 36 montre le test de sphéricité de Bartlett.

Tableau 36: Test de sphéricité de Bartlett (*Cinnamosma* spp.)

Khi ² (Valeur observée)	1032,61
Khi ² (Valeur critique)	146,57
DDL	120
p-value	< 0,0001
alpha	0,05

D'après ce test, la valeur critique de Khi² est largement inférieure à Khi² observée au seuil alpha = 0,05. En effet, on peut rejeter l'hypothèse nulle H₀ d'absence de corrélation significative entre les variables et retenir l'hypothèse alternative H_a (au moins l'une des corrélations entre les variables est significativement différente de 0).

III.1.2. Valeurs propres en ACP (*Cinnamosma* spp.)

Les valeurs propres des axes principaux (variance sur les axes principaux), le pourcentage des informations et le pourcentage cumulé des informations sont exposés dans le tableau 37.

Tableau 37 : Valeurs propres des axes principaux en ACP (*Cinnamosma* spp.)

	F1	F2	F3
Valeur propre	4,37	4,33	1,86
Variabilité (%)	27,28	27,05	11,63
% cumulé	27,28	54,33	65,96

La première composante principale (F1) explique 27,28 % de l'information totale. La deuxième composante principale (F2) explique 27,05 %. La combinaison linéaire des deux premières composantes principales (54,33 %) est déjà représentative des variables car leur pourcentage cumulé est supérieur à 50 %. Les 3 premières composantes principales expliquent 65,96 % de l'information totale ce qui est bien élevé pour représenter les variables.

III.1.3. Caractérisation des variables et des individus (*Cinnamosma* spp.)

La figure 43 représente le plan formé par les axes F1 et F2 montrant la corrélation entre les variables.

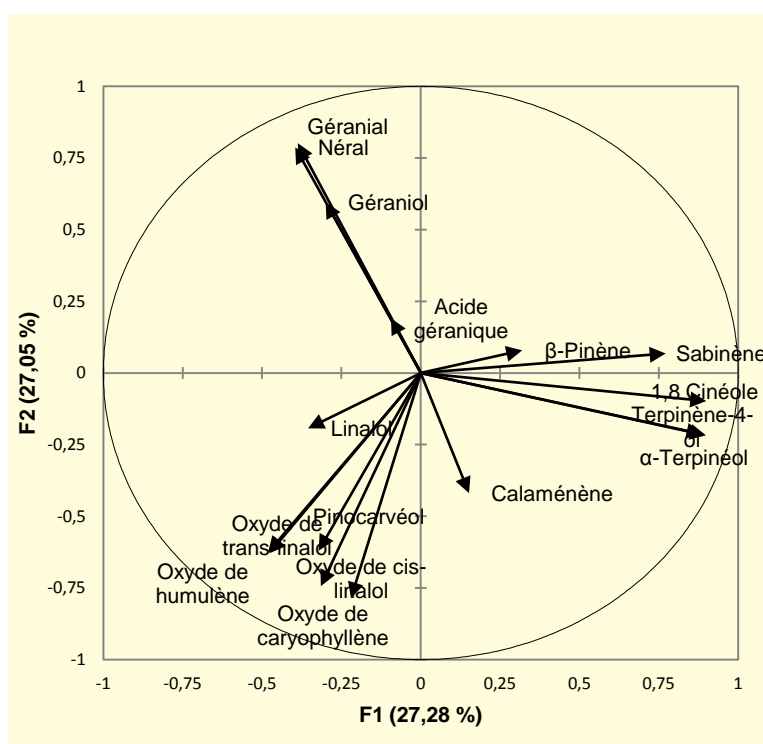


Figure 43: Cercle de corrélation des variables dans l'ACP (*Cinnamosma* spp.)

L'axe F1 est principalement formé par le 1,8-cinéole, l'α-terpinéol, le terpinène 4-ol et le sabinène, avec une corrélation positive respectivement de 0,91; 0,90; 0,89; 0,77. L'axe F2 sépare clairement neuf variables en deux : quatre variables corrélées positivement, le géraniol (0,80), le néral (0,79), le géraniol (0,60), l'acide gérannique (0,19), caractérisant les huiles essentielles de *C. fragrans* d'un côté et cinq variables corrélées négativement, l'oxyde de caryophyllène (0,79), l'oxyde de humulène (0,74), l'oxyde de cis et trans linalol (0,63), et le pinocarvéol (0,62), caractérisant les huiles essentielles de *C. madagascariensis* de l'autre côté (Figure 43).

La figure 44 montre la répartition des 47 individus de *Cinnamosma* sp. en deux groupes

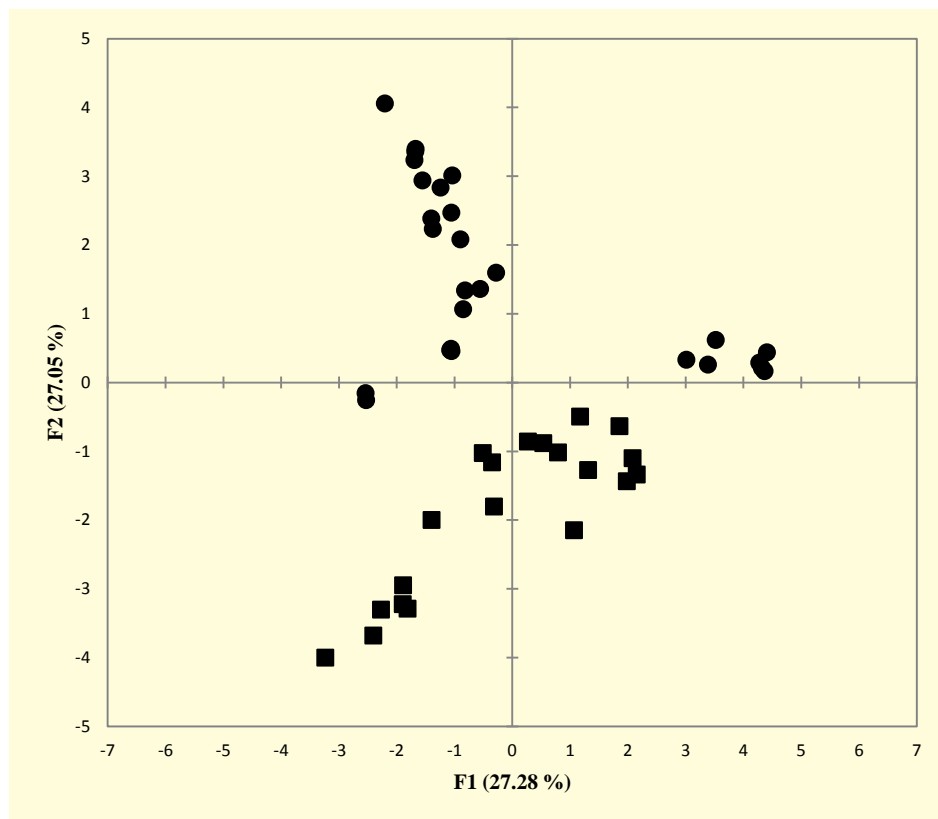


Figure 44: Répartition des 47 individus de *Cinnamosma* spp. en deux groupes

(Rond représente les échantillons de *C. fragrans* et carré ceux de *C. madagascariensis*)

Cette figure montre que les 47 individus de *Cinnamosma* spp. sont répartis en deux groupes :

- le groupe I rassemble tous les individus de *C. fragrans* dont les huiles sont caractérisées par la forte teneur géraniol (18,27 %), néral (13,32 %), géraniol (2,04 %);
- le groupe II est constitué de toutes les huiles de *C. madagascariensis* contenant principalement de l'oxyde de caryophyllène (20,65 %) et de l'oxyde de humulène (3,32 %).

Cette répartition des 47 individus de *Cinnamosma* spp. par l'ACP sera confirmée par la CAH et par l'AFD.

III.2. Classification Ascendante Hiérarchique (*Cinnamosma* spp.)

La classification des 47 individus de *Cinnamosma* sp. (Figure 45) a donné deux classes :

- la classe 1 (C1) est constituée par les 27 individus de *C. fragrans* correspondant au groupe I de l'ACP;
- la classe 2 (C2) rassemble les 20 individus de *C. madagascariensis* correspondant au groupe II de l'ACP.

La figure 45 montre le dendrogramme de la classification des 47 individus de *Cinnamosma* spp.

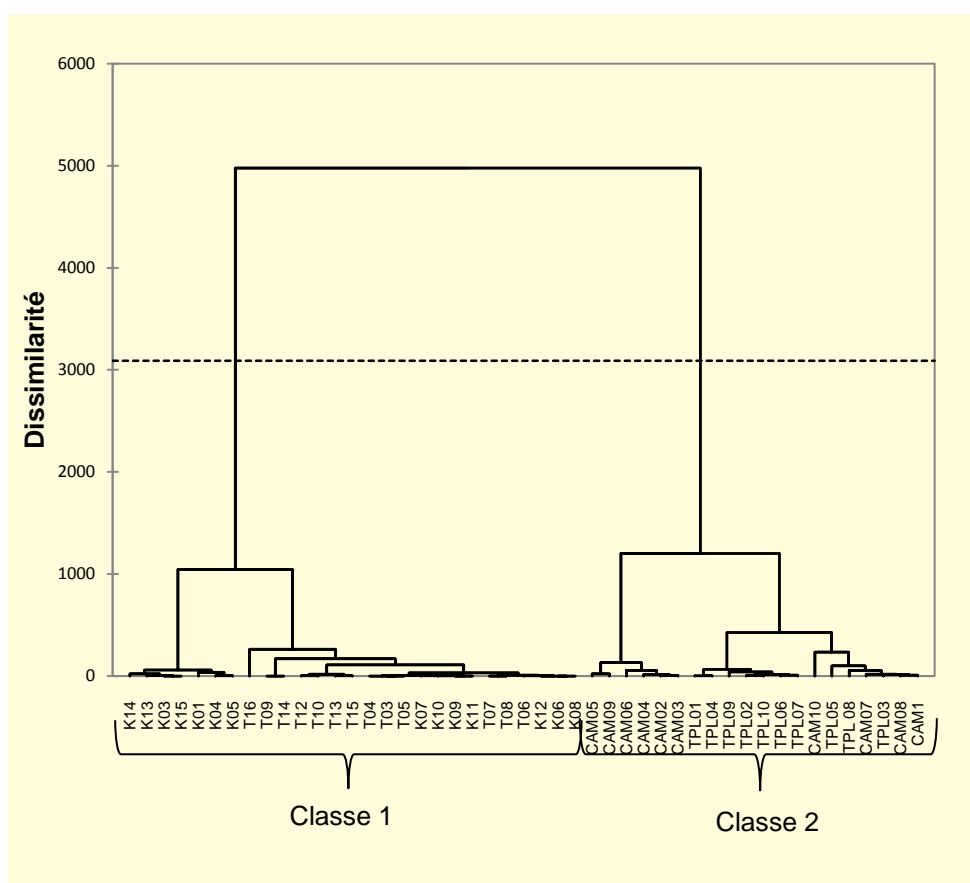


Figure 45: Dendrogramme de la classification des 47 individus de *Cinnamosma* spp.

III.3. Analyse Factorielle Discriminante (*Cinnamosma* spp.)

III.3.1. Test de Lambda de Wilks (*Cinnamosma* spp.)

Le test de Lambda de Wilks (Tableau 38) est un test préliminaire dans la méthode AFD.

*Tableau 38: Test de Lambda de Wilks (*Cinnamosma* spp.)*

Lambda	0,06
F (Valeur observée)	27,74
F (Valeur critique)	1,99
DDL1	16
DDL2	30
p-value	< 0,0001
alpha	0,05

L'ACP a mis en exergue deux groupes d'individus bien distincts. D'après ce test de Lambda de Wilks, au seuil de signification alpha de 0,05, on peut rejeter l'hypothèse nulle (H_0) d'égalité des vecteurs espérances des deux groupes et garder l'hypothèse alternative H_a (au moins l'un des vecteurs moyens est différent d'un autre). La valeur de F critique est inférieure à la valeur de F observée. La différence entre les barycentres des groupes est significative.

III.3.2. Valeurs propres en AFD (*Cinnamosma* spp.)

La valeur propre et le pourcentage de l'axe principal sont indiqués dans le tableau 39 suivant:

*Tableau 39: Valeurs propres et pourcentage de variance en AFD (*Cinnamosma* spp.)*

	F1
Valeur propre	14,80
Discrimination (%)	100
% cumulé	100

L'axe unique F1 comporte à lui seul la totalité des informations (100 %).

III.3.3. Description des groupes (*Cinnamosma* spp.)

Le tableau 40 suivant montre la fréquence des deux groupes formés.

*Tableau 40: Effectifs des groupes formés (*Cinnamosma* spp.)*

Classe	Effectifs	%
1	27	57,45
2	20	42,55

Les 47 échantillons de *Cinnamosma* spp. sont bien repartis et classés dans leur groupe d'appartenance

III.3.4. Caractérisation des groupes (*Cinnamosma* spp.)

Le traitement avec l'AFD a permis de constater que les 47 échantillons sont tous bien classés (à 100 %) dans les deux groupes préétablis lors de l'ACP. La représentation graphique des variables en AFD se trouve dans la figure 46.

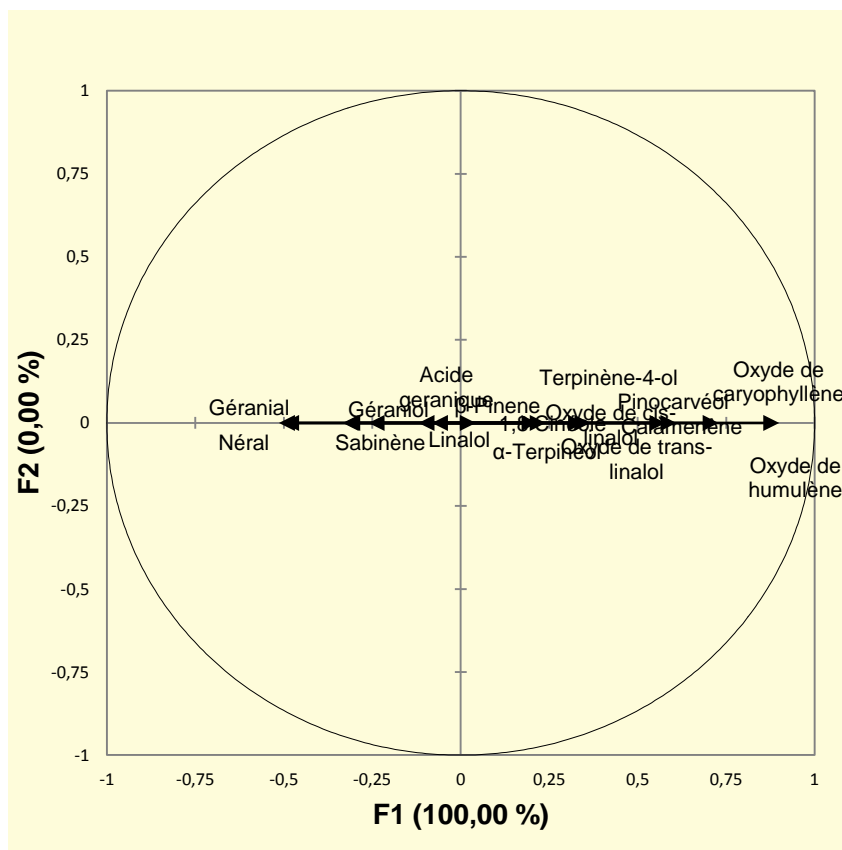


Figure 46: Représentation graphique des variables en AFD pour *Cinnamosma* spp.

La figure 47 montre la représentation graphique des individus en AFD.

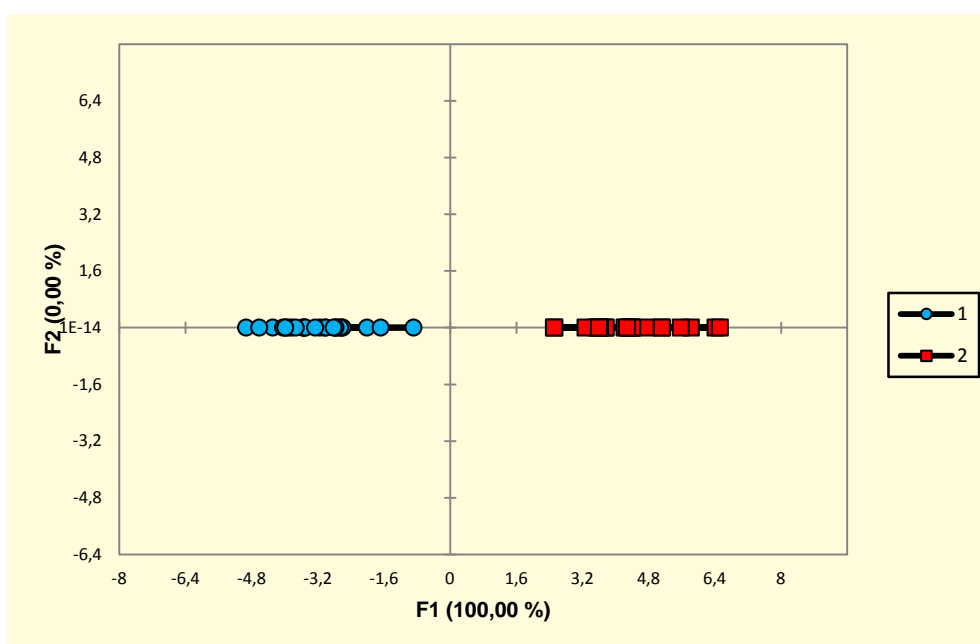


Figure 47: Représentation graphique des individus en AFD pour *Cinnamosma* spp.

La figure 48 représente les constituants chimiques des groupes formés en AFD.

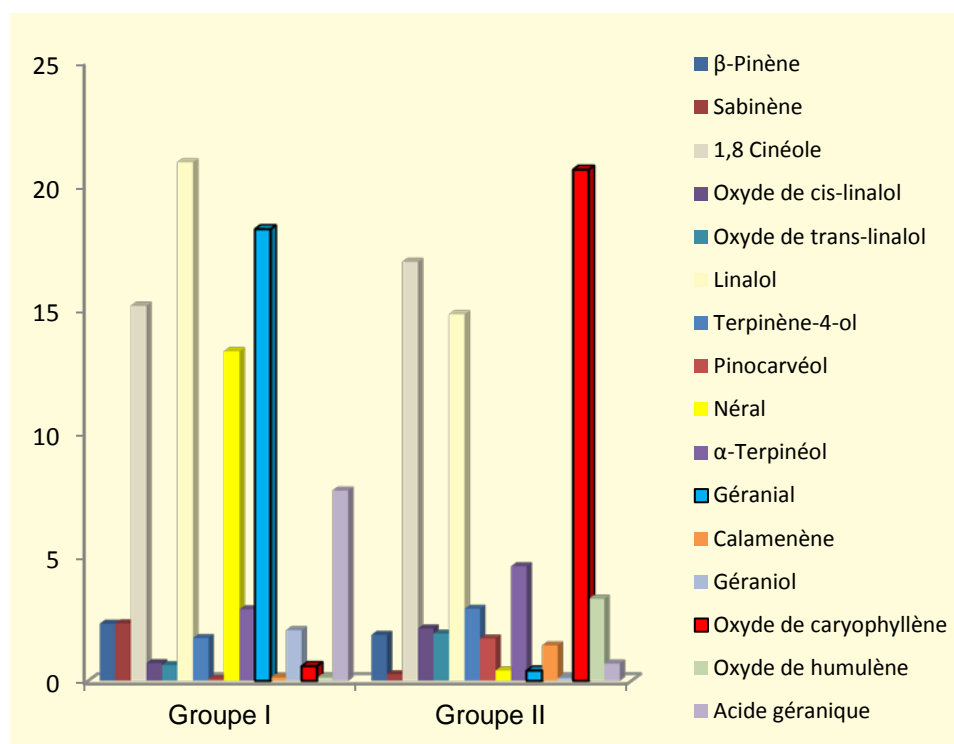


Figure 48: Comparaison des groupes de constituants chimiques des huiles essentielles de *C. fragrans* et *C. madagascariensis*

Les figures 47 et 48 montrent que, même s'il existe une similarité entre la composition chimique des deux *Cinnamosma* sp. par la présence à une teneur > 14 % en linalol et 1,8 cinéole, des différences ont été observées. D'une part, l'huile essentielle de *C. fragrans* se distingue par la présence en teneur élevée en géraniol (18,27 %), néral (13,32 %) et géraniol (2,04 %), tandis que l'huile essentielle de *C. madagascariensis* est caractérisée par des faibles teneurs en ces composants (respectivement de 0,41 %, 0,41 % et 0,11 %). D'autre part, l'huile essentielle de *C. madagascariensis* montre une richesse en oxyde de caryophyllène (20,65 %), en oxyde de humulène (3,32 %), en oxyde de cis linalol (2,12 %), en oxyde de trans linalol (1,91 %) et en pinocarvéol (1,71%) que l'huile essentielle de *C. fragrans* (0,59 %, 0,13 %, 0,72 %, 0,64 %, 0,08 % respectivement). En plus, l'huile essentielle de *C. madagascariensis* contient une quantité infime d'acide gérannique (0,69 %) alors que la teneur en ce composant s'élève à 7,68 % dans l'huile essentielle de *C. fragrans*. Nous pouvons donc avancer que la composition chimique de l'huile essentielle pourrait aider à distinguer les deux espèces de *Cinnamosma* spp..

IV. Discussions des résultats

Le rendement en huile essentielle (3,1 % à 5,5 %), pour *C. fragrans*, est légèrement supérieur à celui trouvé par Ranaivosoa (2006) (1,82 % à 4,4 %) et par Randrianarivelo *et al.* (2009) (1,83 % à 3,4 %). Par ailleurs, le rendement en huile essentielle pour *C. madagascariensis* (1,35 % à 2,84 %) est à peu près similaire au rendement trouvé par Ranaivosoa (2006) (1,16 % à 2,62 %).

L'huile essentielle de *C. fragrans* a une densité relative variant de 0,8663 à 0,8998, légèrement inférieure à ceux de la littérature. Ranaivosoa (2006) a trouvé une densité variant de 0,8924 à 0,9050 et entre 0,9371 et 0,9386 selon Randrianarivelo *et al.* (2009). L'indice de réfraction pour l'huile essentielle de *C. fragrans* et *C. madagascariensis* se situe entre 1,4510 et 1,5517, alors que pour Ranaivosoa (2006) et Randrianarivelo *et al.* (2009), cet indice varie de 1,4558 à 1,4685.

L'étude chimique des deux huiles essentielles de *Cinnamosma sp.*, en utilisant l'Analyse en Composantes Principales, la Classification Automatique Hiérarchique, et l'Analyse Factorielle Discriminante, a mis en évidence quatre chémotypes pour l'huile essentielle de *C. fragrans* et deux chémotypes pour l'huile essentielle de *C. madagascariensis* :

- *C. fragrans* :
 - le chémotype I à forte teneur en linalol (90,47 %) est comparable au profil chimique décrit par Schulte *et al.* (1972), Ranaivoarisoa (2000), Randrianarivelo *et al.* (2009);
 - le chémotype II à forte teneur en 1,8 cinéole (56,44 %) est en concordance avec les résultats publiés par Ravoninahitra-Ravalison (2005), Razanamparany (2005), Tomboarisendra (2005), Arnal-Schnebelen *et al.* (2007), Ranaivosoa (2006) et Randrianarivelo *et al.* (2009);
 - le chémotype III à forte teneur en néral et géraniol (respectivement de 30,63 % et de 41,45 %) est similaire au profil chimique décrit par Rabelohataona (2007) ;
 - le chémotype IV est caractérisé par la forte teneur en acide gérannique (48,75 %). Ce constituant a été décrit par Ranaivosoa (2006).

- *C. madagascariensis* :
 - le chémotype I, caractérisé par la forte teneur en 1,8 cinéole (30,89 %) est similaire au profil chimique décrit par Rasendra (1994), Ranaivosoa (2006) et Rabelohataona (2007) ;
 - le chémotype II est caractérisé par la forte teneur en oxyde de caryophyllène (20,60 %). Ce constituant est toujours présent dans les huiles essentielles de *C. madagascariensis* analysées par Rasendra (1994), Ranaivosoa (2006), Rabelohataona (2007).

La répartition en quatre chémotypes pour les huiles essentielles de *C. fragrans* et en deux chémotypes pour les huiles essentielles de *C. madagascariensis* n'est pas liée à la zone de collecte. En effet, on remarque la présence, au moins de deux chémotypes différents, dans un même site. Par exemple, le chémotype III (néral et géraniol) et le chémotype IV (acide gérannique), de l'huile essentielle de *C. fragrans* ont été déterminés en même temps à Tsaramandroso et à Katsepy (Razafimamonjison *et al.* 2011a). Les travaux menés par Andrianoelisoa *et al.* (2006) semblent correspondre à notre cas. En effet, ils ont décrit quatre chémotypes de l'huile essentielle de *Ravensara aromatica*, cependant la répartition de ces chémotypes n'est pas liée à l'origine géographique des échantillons. Andrianoelisoa (2008) a mentionné aussi que des arbres de chémotypes différents peuvent être rencontrés côte à côte sur un même site. Les travaux menés par Ireland *et al.* (2002) sur les huiles essentielles de *Melaleuca quinquenervia* et ceux menés par Azevedo *et al.* (2001) sur les huiles essentielles de *Hyptis suaveolens* sont aussi similaires à nos résultats. Ces auteurs ont montré que la répartition en plusieurs chémotypes de leurs huiles essentielles n'est pas liée à l'origine géographique.

La composition chimique des deux huiles essentielles de *Cinnamosma* sp. reste invariable, tant qualitative que quantitative, au cours de l'année (Razafimamonjison *et al.* 2011a). Du point de vue qualitatif, nos résultats sont en accord avec les travaux effectués par Coronel *et al.* (2006) sur les huiles essentielles de *Lippia integrifolia* et ceux effectués par Milos *et al.* (2001) sur les huiles essentielles de *Satureja montana* et *S. cuneifolia*. Cependant, du point de vue quantitatif, les résultats ne sont pas identiques, une large variation de la teneur en composant principal des huiles essentielles de ces auteurs a été observée au cours de l'année.

En général, le rendement en huile essentielle varie au cours de l'année. Le rendement élevé est obtenu durant la saison sèche (mai – septembre) tandis que le plus faible est obtenu durant la saison de pluie (octobre – avril). Ceci est en accord avec Sivropoulou *et al.* (1997), pendant la saison de pluie la sève est diluée, la teneur en essence de la plante diminue.

A priori, les facteurs écologiques et climatiques ne peuvent raisonnablement expliquer la tendance de répartition des individus de *Cinnamosma sp.*. Ainsi, l'hypothèse d'une variation due à l'origine génétique et celle de l'interaction entre le génotype et l'environnement n'est pas à exclure (Cavaleiro *et al.*, 2003).

L'huile essentielle de *C. fragrans* est distinguée par la forte teneur en néral (13,32 %) et géraniol (18,27 %) et acide gérannique (7,68 %), tandis que l'huile essentielle de *C. madagascariensis* présente deux constituants majeurs, l'oxyde de caryophyllène (20,65 %) et l'oxyde de humulène (3,32 %). Ces résultats montrent bien l'intérêt de l'utilisation de la composition chimique de l'huile essentielle, dans le but d'un chimio taxonomique, pour caractériser et différencier ces deux espèces (Razafimamonjison *et al.* 2011a). Kayser *et al.* (1998) ont utilisé la composition chimique des huiles essentielles pour différencier les deux espèces de *Pelargonium* : *P. sidoides* et *P. reniforme*. De même, Cole *et al.* (2008) ont aussi montré que les huiles essentielles *Myrcianthes fragrans* est distingué par le 1,3,5-trimethoxybenzène tandis que les huiles essentielles de *M. rhopaloïdes* par le linalol. D'autres auteurs ont mentionné aussi que la composition chimique de l'huile essentielle peut être utilisée pour différencier des espèces morphologiquement identiques : pour le genre *Clerodendrum* (Verbenaceae) (Hsiao *et al.*, 1995), pour le genre *Leptospermum* (Myrtaceae) (Brophy *et al.*, 1998) et pour le genre *Cannabis* (Hillig, 2004).

V. Conclusion partielle

L'étude chimique des deux huiles essentielles de *Cinnamosma* sp., en utilisant l'AC P, la CAH, et l'AFD, a mis en évidence quatre chémotypes pour l'huile essentielle de *C. fragrans* et deux chémotypes pour l'huile essentielle de *C. madagascariensis* :

- *C. fragrans* :
 - le chémotype I à forte teneur en linalol (90,47 %) ;
 - le chémotype II à forte teneur en 1,8 cinéole (56,44 %) ;
 - le chémotype III à forte teneur en néral 30,63 % et géraniol (41,45 %) ;
 - le chémotype IV est caractérisé par la forte teneur en acide gérannique (48,75 %).
- *C. madagascariensis* :
 - le chémotype I est caractérisé par la forte teneur en 1,8 cinéole (30,89 %) ;
 - le chémotype II est caractérisé par la forte teneur en oxyde de caryophyllène (20,60 %).

La composition chimique des deux huiles essentielles de *Cinnamosma* sp. reste invariable, tant qualitative que quantitative, au cours de l'année. Aucune variation importante des teneurs en constituants principaux de chaque chémotype n'est observée au cours de l'année.

**PARTIE IV : Propriétés biologiques et tests
en éclosionerie de crevettes de chaque
chénotype**

La production de crevettes d'élevage est une activité économique importante à Madagascar. Cependant, l'utilisation des antibiotiques en aquaculture dans le monde a été associée à l'émergence de résistances bactériennes qui diminuent l'efficacité des antibiotiques et perturbent les équilibres microbiens dans les écosystèmes concernés. Les huiles essentielles de *Cinnamosma* spp., par leurs propriétés antibactériennes pourraient remplacer les antibiotiques chimiques conventionnels (Randrianarivelo *et al.*, 2009 et Randrianarivelo *et al.*, 2010). Cependant, ces propriétés varient d'une huile à l'autre selon les principes actifs qu'elle renferme. Les huiles des différents chémotypes des deux espèces de *Cinnamosma* spp. ont été ainsi analysées *in vitro* pour leurs propriétés biologiques et testées en éclosion de crevettes pour substituer les antibiotiques conventionnels.

I. Résultats des analyses microbiologiques in vitro

I.1. Identification des isolats de larves de l'éclosion

4 colonies par bac d'essai sont isolées et purifiées suivant le jour d'élevage J₀, J₉ et J₁₈. En effet, 180 colonies ont été isolées et purifiées (Cf tableau 8 page 58). Ces souches isolées ont été stockées à 4° C sur le milieu TCBS avant l'identification. Le tableau 41 montre l'identification préliminaire des 180 isolats de larves par la coloration de Gram, le test d'oxydase et le test de catalase.

I.1.1. Identification préliminaire

Tableau 41: Caractéristiques des isolats de larves de l'éclosion

	Gram	Oxydase	Catalase
<i>V. parahaemolyticus</i>	-	+	+
<i>V. alginolyticus</i>	-	+	+
<i>Photobacterium damsela</i>	-	+	+
<i>V. vulnificus</i>	-	+	+
<i>V. hollisae</i>	-	+	+
<i>V. fluvialis</i>	-	+	+

D'après ce tableau, les isolats de larves sont tous des bactéries Gram - et possèdent des catalases et oxydases positifs. Ce sont tous donc des non entérobactéries. En effet, pour avoir le nom exact de l'espèce, la galerie API 20 NE (Biomérieux Marcy l'Etoile France Ref 20 050) a été utilisée.

I.1.2. Identification des isolats avec la galerie API 20 NE

Le tableau 42 montre l'identification des isolats de larves avec la galerie API 20 NE pour chaque traitement suivant les jours d'élevage J_0 , J_9 , J_{18} .

Tableau 42: Identification des isolats de larves avec la galerie API 20 NE pour chaque traitement suivant les jours d'élevage J_0 , J_9 , J_{18} .

	TRAITEMENTS					Total
	E	HE ₁	HE ₂	HE ₃	T	
J₀ (stade N1)						
<i>V. parahaemolyticus</i>	1	0	0	0	0	1
<i>V. alginolyticus</i>	5	6	5	6	6	28
<i>V. vulnificus</i>	2	2	2	1	1	8
<i>V. hollisae</i>	0	0	1	1	1	3
<i>V. fluvialis</i>	4	4	4	3	3	18
<i>Photobacterium damsela</i>	0	0	0	1	1	2
Nombre total d'isolats	12	12	12	12	12	60
J₉ (stade M1)						
<i>V. parahaemolyticus</i>	2	2	1	1	1	7
<i>V. alginolyticus</i>	3	4	4	4	4	19
<i>V. vulnificus</i>	1	1	1	1	1	5
<i>V. hollisae</i>	3	2	3	2	2	12
<i>V. fluvialis</i>	2	2	1	2	2	9
<i>Photobacterium damsela</i>	1	1	2	2	2	8
Nombre total d'isolats	12	12	12	12	12	60
J₁₈ (stade PL 8)						
<i>V. parahaemolyticus</i>	2	2	1	2	3	10
<i>V. alginolyticus</i>	2	2	2	2	1	9
<i>V. vulnificus</i>	1	1	1	1	2	6
<i>V. hollisae</i>	3	3	3	3	2	14
<i>V. fluvialis</i>	2	1	1	1	1	6
<i>Photobacterium damsela</i>	2	3	4	3	3	15
Nombre total d'isolats	12	12	12	12	12	60

D'après ce tableau, les souches isolées des larves de crevettes sont majoritairement représentées par des *Vibrio* spp. quelque soit le stade de développement et quelque soit le traitement.

I.2. Concentrations minimales inhibitrices de chaque chémotype et leurs composants purs vis-à-vis des souches de référence

Rappelons que les huiles essentielles utilisées pour les analyses microbiologiques et les tests en éclosion de crevettes sont issues des mélanges homogènes de feuille des arbres de même chémotype. Le tableau 43 résume les 16 constituants majeurs de l'huile essentielle de *C. fragrans* et de *C. madagascariensis*.

Tableau 43: Principaux constituants chimiques de l'huile essentielle de *C. fragrans* et de *C. madagascariensis* (% relatif).

Composition	<i>C. fragrans</i>				<i>C. madagascariensis</i>	
	Chémotype				I	II
	I	II	III	IV	I	II
β-Pinène	0,91	6,75	3,39	6,54	1,18	1,16
Sabinène	0,16	11,83	0,02	0,28	1,35	0,02
1,8 Cinéole	0,99	56,08	0,53	1,24	46,18	0,84
Oxyde de cis-linalol	5,15	0,01	0,20	0,15	1,48	2,55
Oxyde de Trans-linalol	5,20	tr	0,17	0,14	1,27	2,19
Linalol	86,49	1,22	5,61	6,62	10,53	6,67
Terpinène-4-ol	0,00	5,11	0,27	0,62	2,49	0,64
Pinocarvéol	-	0,03	-	0,06	0,29	6,20
Néral	0,01	-	30,04	5,17	0,26	1,52
α-Terpinéol	0,32	9,06	0,42	1,06	5,71	2,03
Géranial	0,01	0,17	40,20	7,94	0,36	0,02
Géraniol	-	-	6,72	1,33	0,24	-
Calamenène	tr	-	0,08	0,25	0,00	0,62
Oxyde de Caryophyllène	0,07	0,10	-	0,87	10,04	34,74
Oxyde de humulène	0,02	0,05	-	0,26	0,87	6,19
Acide géranique	0,05	-	2,54	44,98	0,42	0,10

Le tableau 44 montre les concentrations minimales inhibitrices de chaque chémotype et leurs composants purs vis-à-vis des souches de références.

Tableau 44 : Concentrations minimales inhibitrices de chaque chémotype et leurs composants purs vis-à-vis des souches de référence (mg/ml)

Bactéries	CMI (mg/ml)										
	<i>C. fragrans</i>				<i>C. madagascariensis</i>			Composants purs			
	Chémotype	Chémotype	Chémotype	Chémotype	I	II	LIN	CIN	CIT	CAR	GER
	I	II	III	IV	I	II	LIN	CIN	CIT	CAR	GER
gram -											
<i>V. alginolyticus</i>	2,5	2,5	2,5	5	2,5	5	5	5	5	5	5
<i>V. harveyi</i>	0,63	0,63	0,63	5	0,63	1,25	1,25	1,25	1,25	2,5	5
<i>V. parahaemolyticus</i>	2,5	1,25	2,5	5	2,5	2,5	5	1,25	2,5*	5	10
<i>K. pneumoniae</i>	2,5	2,5	2,5	5*	2,5	5	2,5*	5	5	5	10
<i>E. coli</i>	1,25	2,5	2,5	2,5	1,25	2,5	2,5	2,5	5	5	5
<i>S. antarctica</i>	5	5	10	10	5	10*	10	10	10	10	10*
<i>P. aeruginosa</i>	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20
gram +											
<i>E. faecalis</i>	0,63	0,63	1,25	2,5*	0,63	2,5*	1,25	0,63*	2,5	5*	5*
<i>S. aureus</i>	0,16	0,31	0,31	0,63	0,63	0,63*	1,25	0,63	1,25	2,5	2,5*
Valeurs sans * : CMB = CMI											
Valeurs avec *: CMB > CMI											

Les résultats montrent que les bactéries Gram + sont plus sensibles que les bactéries Gram -. Dans tous les cas, la CMI de chaque chémotype est identique à celle de CMB (valeurs sans astérisque) (effets bactéricides), sauf pour le chémotype IV (*C. fragrans*) vis-à-vis de *K. pneumoniae* et *E. faecalis* et pour le chémotype II (*C. madagascariensis*) vis-à-vis de *S. antarctica*, *E. faecalis* et *S. aureus*, dont la CMB est supérieure à la CMI (effets bactériostatiques) (valeurs avec astérisque).

Après les analyses statistiques (ANOVA : test de Fisher HSD), les quatre chémotypes de *C. fragrans* présentent des variations de la CMI vis-à-vis de tous les microorganismes testés ($P < 0.05$) : chémotype I (CMI: 0,16 à 2,5 mg/ml) \geq chémotype II (CMI: 0,31 à 2,5 mg/ml) \geq chémotype III (CMI: 0,31 à 10 mg/ml) $>$ chémotype IV (CMI : 0,63 à 10 mg/ml). Les huiles essentielles du chémotype I, II et III montrent une faible CMI que les deux derniers chémotypes vis-à-vis des trois *Vibrio* spp. et *K. pneumoniae*, dont la plus faible CMI (0,63 mg/ml) est observée sur *V. harveyi*. Une inhibition moyenne est observée sur *S. antarctica* (CMI : 5mg/ml à 10mg/ml). Pour les huiles essentielles de *C. madagascariensis*, le chémotype I est plus actif que le chémotype II, sauf pour *V. parahaemolyticus* et *S. aureus* dont la CMI du chémotype I est identique au CMI du chémotype II. *P. aeruginosa* possède la plus haute valeur de CMI pour tous les chémotypes testés (CMI >20 mg/ml).

Pour confirmer la relation entre les constituants des huiles essentielles de deux *Cinnamosma* spp. et l'activité antimicrobienne, des composants purs, linalol (LIN), 1,8 cinéole, (CIN), citral (CIT) (mélange de néral et géraniol), oxyde de caryophyllène (CAR) et acide gérannique (GER) ont été aussi testés sur les neuf souches. En effet, le linalol, le 1,8 cinéole et le citral possèdent une activité antimicrobienne plus élevée que l'acide gérannique et l'oxyde de caryophyllène vis-à-vis de toutes les souches testées.

Par ailleurs, les composants purs montrent une plus faible inhibition que les huiles essentielles vis-à-vis de toutes les bactéries. Par exemple, la CMI de chaque chémotype sur *V. harveyi*, *S. aureus* et *E. coli* est moins élevée que celle des composants purs. Ainsi l'activité antibactérienne des huiles essentielles n'est pas seulement due aux constituants majeurs.

I.3. Concentrations minimales inhibitrices de chaque chémotype et leurs composants purs vis-à-vis des souches bactériennes isolées de l'écloserie

Le tableau 45 montre les concentrations minimales inhibitrices de chaque chémotype et leurs composants purs vis-à-vis des souches isolées de l'écloserie.

Tableau 45 : Concentrations minimales inhibitrices de chaque chémotype et leurs composants purs vis-à-vis des souches isolées de l'écloserie (mg/ml)

Bactéries	CMI (mg/ml)										
	<i>C. fragrans</i>				<i>C. madagascariensis</i>		Composants purs				
	Chémotype				Chémotype		LIN	CIN	CIT	CAR	GER
	I	II	III	IV	I	II					
<i>V. parahaemolyticus</i>	2,5	5	5	5	2,5	5	5	5	10	10*	1
<i>V. vulnificus</i>	2,5	1,25	2,5	5	2,5	2,5	5	2,5	2,5	5	10*
<i>V. hollisae</i>	0,63	0,63	0,63	5	2,5	5*	1,25	1,25	5	5*	10*
<i>V. alginolyticus</i>	2,5	2,5	5	5*	2,5	10	2,5	5	5	5	10
<i>V. fluvialis</i>	2,5	2,5	2,5	10	2,5	10	10	10	10	10*	10
<i>P. damsela</i>	1,25	1,25	1,25	5*	1,25	2,5*	2,5	2,5	2,5*	5	10*

Valeurs sans * : CMB = CMI
Valeurs avec * : CMB > CMI

D'après le tableau 45, les trois premiers chémotypes de *C. fragrans* et le chémotype I du *C. madagascariensis*, avec une CMI comprise entre 0,63 à 2,5 mg/ml, sont plus actives que les autres chémotypes dont la CMI varie de 2,5 à 10 mg/ml vis-à-vis des souches testées. *V. fluvialis* est le plus résistant (CMI : 2,5 à 10 mg/ml), tandis que *V. hollisae* (0,63 à 5 mg/ml) est le plus sensible.

Dans tous les cas, les huiles essentielles possèdent des effets bactéricides (CMI = CMB), sauf pour le chémotype IV (*C. fragrans*) vis-à-vis de *P. damsela* et *Vibrio alginolyticus* et pour le chémotype II (*C. madagascariensis*) vis-à-vis de *P. damsela* et *Vibrio hollisae* (CMI > CMB : effets bactériostatiques).

Les composants purs montrent une faible inhibition que les tous les chémotypes vis-à-vis des *Vibrio* spp.

II. Résultats des tests en éclosion de crevettes

Les huiles essentielles de deux espèces de *Cinnamosma* spp. possèdent des activités antimicrobiennes tant sur les souches de référence que sur les souches isolées de l'éclosion. Ainsi la partie suivante a pour objectif d'évaluer l'effet de ces huiles essentielles sur la concentration bactérienne et le taux de survie des larves.

D'après Randrianarivelo *et al.* (2010), les deux huiles essentielles de *C. fragrans*, respectivement caractérisées par la forte teneur en linalol (95,8 %) et 1,8 cinéole (71,6 %), possèdent des activités antimicrobiennes ; et elles ont le potentiel de contrôler la charge bactérienne et d'améliorer le taux de survie des larves. En effet nous n'avons plus effectué les tests *in vivo* sur ces huiles essentielles ; seuls les trois types d'huiles essentielles riches en néral et géraniol, en oxyde de caryophyllène et en acide gérannique ont été testés.

II.1. DL 50 des quatre stades larvaires avec les trois huiles essentielles

Le tableau 46 résume les DL 50 (moyenne des trois répétitions) des quatre stades larvaires avec les trois huiles essentielles.

Tableau 46 : DL 50 des quatre stades larvaires avec les trois huiles essentielles (mg/ml)

Traitements / Stade	DL50 (mg/l)			
	Nauplii (N6)	Zoé (Z3)	Mysis (M3)	Post-larve (PL1)
Néral et géraniol	872,11	883,89	884,27	902,72
Oxyde de Caryophyllène	875,28	883,16	886,72	902,99
Acide gérannique	875,33	887,50	887,83	903,77

La plus faible DL 50 (872,11 mg/l) est observée au stade nauplii pour l'huile essentielle à néral et géraniol, tandis que la plus élevée est obtenue avec l'acide gérannique au stade post-larve (903,77 mg/l). Pour mettre en évidence s'il y a une différence significative entre la DL 50 des trois huiles essentielles, quelque soit le stade ; et aussi s'il y a une différence significative entre la DL 50 des quatre stades, quelque soit l'huile essentielle, nous avons procédé au test de Kruskal Wallis.

II.1.1. Différence significative entre la DL 50 des trois huiles essentielles, quelque soit le stade

La matrice de données est formée comme suit : 12 lignes (DL 50 des quatre stades fois 3 répétitions) et 3 colonnes (trois huiles essentielles) (Annexe 19 : matrice de données).

a) Statistique descriptive (effet huile essentielle)

Le tableau 47 donne le minimum, le maximum et la moyenne de la DL 50 de chaque huile essentielle.

Tableau 47 : Minimum, maximum et moyenne de la DL 50 de chaque huile essentielle (mg/l)

Huile essentielle	Minimum	Maximum	Moyenne
Néral et géraniol	871,66	906,66	885,75
Oxyde de caryophyllène	874,50	904,16	887,04
Acide gérannique	874,66	907,00	888,61

La plus faible DL 50 (valeur moyenne : 885,75 mg/l) est obtenue avec l'huile essentielle à néral et géraniol, tandis que la valeur plus élevée est obtenue avec l'acide gérannique (valeur moyenne : 888,61 mg/l). L'huile essentielle à néral et géraniol est donc plus toxique que l'huile essentielle à acide gérannique.

b) Test de Kruskal Wallis sur la DL 50 (effet huile essentielle)

Le tableau 48 donne le résultat du test de Kruskal Wallis

Tableau 48 : Résultat du test de Kruskal Wallis sur la DL 50 (effet huile essentielle)

K (Valeur observée)	1,26
K (Valeur critique)	5,99
DDL	2
p-value (bilatérale)	0,53
alpha	0,05

Etant donné que la valeur de p-value calculée (0,53) est supérieure au niveau de signification seuil $\alpha = 0,05$, on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle H_0 (pas de différence significative entre la valeur de DL 50 des trois huiles essentielles) (Tableau 48).

Le tableau 49 montre la répartition des huiles essentielles selon la DL 50.

Tableau 49 : Répartition des huiles essentielles selon la DL 50

Huile essentielle	Groupe
Néral géraniel	A
Oxyde de caryophyllène	A
Acide gérannique	A

D'après la comparaison multiple par paires suivant la procédure de Dunn / Test bilatéral (Tableau 49), les trois huiles essentielles donnent une DL 50 identique et appartiennent au même groupe (groupe A). En résumé, il n'y a pas de différence significative entre la valeur de DL 50 des trois huiles essentielles quelque soit le stade de développement larvaire.

II.1.2. Différence significative entre la DL 50 des quatre stades, quelque soit l'huile essentielle

La matrice de données est formée comme suit : 09 lignes (trois huiles essentielles fois trois répétitions) et quatre colonnes (quatre stade) (Annexe 20 : matrice de données).

a) Statistique descriptive (effet stade)

Le tableau 50 donne le minimum, le maximum et la moyenne de la DL 50 de chaque stade.

Tableau 50 : Minimum, maximum et moyenne de la DL 50 de chaque stade (mg/l)

Stade	Minimum	Maximum	Moyenne
Nauplii	871,66	876,33	874,24
Zoé	876,50	888,50	884,85
Mysis	882,33	889,16	886,28
Post-larve	899,16	907,00	903,16

La plus faible DL 50 (valeur moyenne : 874,24 mg/l) est observée au stade nauplii, tandis que la valeur plus élevée est observée au stade post-larve (valeur moyenne : 903,16 mg/l).

b) Test de Kruskal Wallis sur DL 50 (effet stade)

Le tableau 51 donne le résultat du test de Kruskal Wallis

Tableau 51 : Résultat du test de Kruskal Wallis sur la DL 50 (effet stade)

K (Valeur observée)	29,66
K (Valeur critique)	7,81
DDL	3
p-value (bilatérale)	< 0,0001
alpha	0,05

Etant donné que la valeur p-value calculée est inférieure ($< 0,0001$) au niveau de signification $\alpha=0,05$, on doit rejeter l'hypothèse nulle H_0 , et retenir l'hypothèse alternative H_a (existe une différence significative entre la DL 50 de chaque stade de développement larvaire) (Tableau 51).

Le tableau 52 donne répartition des quatre stades selon la DL 50 par la méthode de comparaison multiple par paires suivant la procédure de Dunn / Test bilatéral.

Tableau 52 : Répartition des quatre stades selon la DL 50

Stade	Groupes
Nauplii	A
Zoé	B
Mysis	B
Post-larve	C

D'après ce tableau trois groupes ont été formé :

- le groupe A est formé par des larves du stade nauplii avec une DL 50 variant de 871,66 mg/l à 876,33 mg ml ;
- le groupe B englobe les larves du stade Zoé et Mysis dont la DL 50 obtenue varie de 867,50 mg/ml à 889,16 mg/ml.
- le groupe C, avec une DL 50 comprise entre 899,16 mg/ml et 907,00 mg/ml, est formé par les Post-larves.

En résumé il existe une différence significative entre la DL 50 de chaque stade quelque soit l'huile essentielle (DL 50 Nauplii $<$ DL 50 Zoé, DL 50 Mysis $<$ DL 50 Post-larve). Les nauplii sont donc plus sensibles aux huiles essentielles que les post-larves.

II.2. Comparaison de l'effet des trois huiles essentielles, antibiotique et témoin sur la concentration bactérienne et le taux de survie des larves

Les traitements aux huiles essentielles et à l'antibiotique (Erythromycine) sont effectués à 7 heures du matin et pendant les jours d'élevage : J₃, J₅, J₇, J₁₀, J₁₂ et J₁₄ sur un cycle total de 18 jours. La concentration de l'érythromycine est de 20 µg/ml tandis que celle des huiles essentielles correspond à la plus faible concentration minimale inhibitrice (0,63 mg/ml) déterminée *in vitro*. Pour avoir des résultats fiables, chaque traitement (huiles essentielles, antibiotique et témoin) a été effectué en triple.

II.2.1. Evolution de la concentration bactérienne des larves ensemencés sur Marine agar (Flore Mésophile Totale : FMT) durant 18 jours d'élevage

La figure 49 montre l'évolution de la concentration bactérienne obtenue sur Marine agar (FMT) avec des larves traitées par les huiles essentielles, antibiotique et témoin (sans huile ni antibiotique) pendant 18 jours d'élevage.

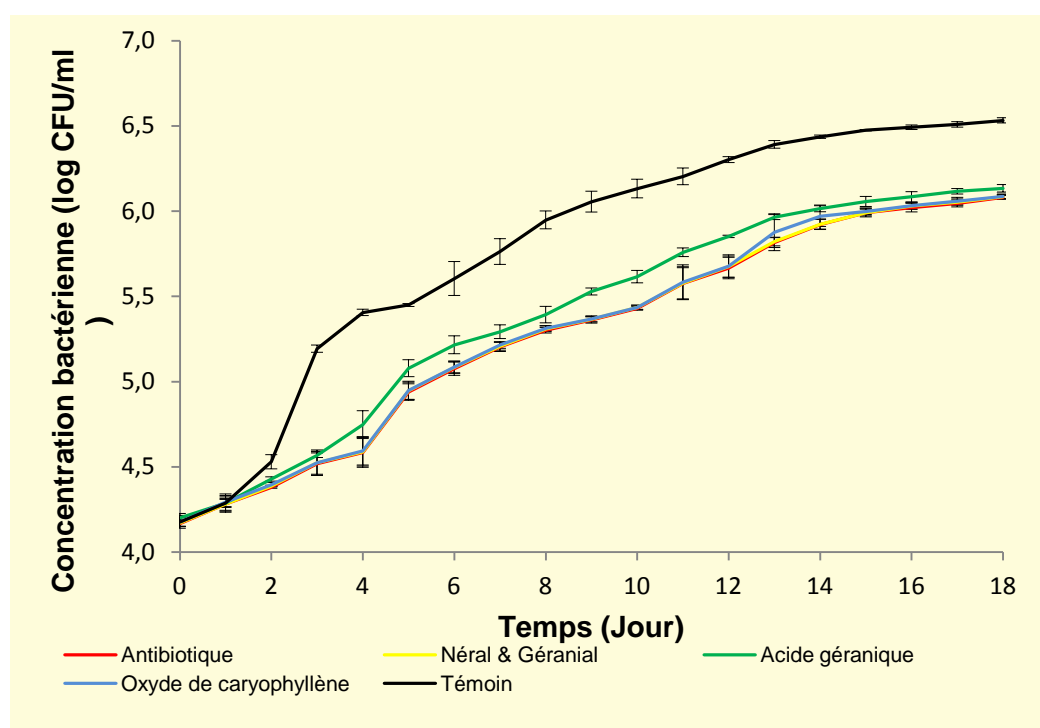


Figure 49 : Evolution de la concentration bactérienne (log CFU/ml) obtenue sur Marine agar (FMT) avec des larves traitées par des huiles essentielles, antibiotique et témoin pendant 18 jours d'élevage (Valeurs correspondant à la moyenne de trois répétitions).

A J_0 la moyenne de la concentration bactérienne des traitements est de 4,18 log CFU/ml \pm 0,01, à J_9 elle est de 5,54 log CFU/ml \pm 0,21 pour arriver à 6,18 log CFU/ml \pm 0,3 au J_{18} . La concentration bactérienne évolue donc au cours du temps, l'écart type devient de plus en plus conséquent. Cette augmentation de l'écart type permet de supposer qu'il y a une différence significative entre la charge en concentration bactérienne des traitements.

Pour mettre en évidence cette différence, le test de Kruskal Wallis a été utilisé. La matrice de données est formée comme suit : 57 lignes (cycle de 18 jours = 19 fois trois répétitions) et 5 colonnes (3 huiles essentielles, 1 antibiotique et 1 témoin) (Annexe 21 : matrice de données).

a) Test de Kruskal Wallis sur la concentration en FMT

Le tableau suivant donne le résultat du test de Kruskal Wallis

Tableau 53 : Résultat du test de Kruskal Wallis sur la concentration en FMT

K (Valeur observée)	26,990
K (Valeur critique)	9,488
DDL	4
p-value (bilatérale)	< 0,0001
alpha	0,05

Etant donné que la p-value calculée (< 0,0001) est inférieure au niveau de signification $\alpha=0,05$, on doit rejeter l'hypothèse nulle H_0 , et retenir l'hypothèse alternative H_a (existe une différence significative entre la concentration bactérienne de chaque traitement) (Tableau 53).

b) Répartition des cinq traitements selon la concentration en FMT

Le tableau 54 présente la répartition des cinq traitements selon la concentration bactérienne obtenue sur Marine agar par la méthode de comparaison multiple par paires suivant la procédure de Dunn / Test bilatéral.

Tableau 54 : Répartition des cinq traitements selon la concentration en FMT

Traitements	Groupes
Antibiotique	A
Néral & géranial	A
Oxyde de Caryophyllène	A
Acide géranique	A
Témoin	B

D'après le tableau 54, il existe une différence significative entre la concentration bactérienne des prélèvements larvaires traités avec l'antibiotique, huiles essentielles (groupe A) et le témoin (groupe B), sans antibiotique ni huiles essentielles. Aucune différence significative n'est, par contre, observée entre la concentration bactérienne des prélèvements larvaires traités avec l'antibiotique et les trois huiles essentielles.

En résumé, les trois huiles essentielles ont un effet similaire à l'antibiotique. Ces trois huiles essentielles ont donc la potentialité de réduire la charge bactérienne (FMT) des prélèvements larvaires.

II.2.2. Evolution de la concentration bactérienne des prélèvements larvaires ensemencés sur TCBS (*Vibrio* sp.) durant 18 jours d'élevage

La figure 50 montre l'évolution de la concentration bactérienne obtenue sur TCBS avec des larves traitées par les huiles essentielles, antibiotique et témoin (sans huile ni antibiotique) pendant 18 jours d'élevage.

A J_0 la moyenne de la concentration bactérienne des traitements est de 4,12 log CFU/ml \pm 0,02, à J_9 elle est de 4,52 log CFU/ml \pm 0,33 pour arriver à 4,71 log CFU/ml \pm 0,49 au J_{18} . La concentration bactérienne évolue donc au cours du temps, l'écart type devient de plus en plus conséquent. Cette augmentation de l'écart type permet de supposer qu'il y a une différence significative entre la charge en concentration bactérienne des traitements.

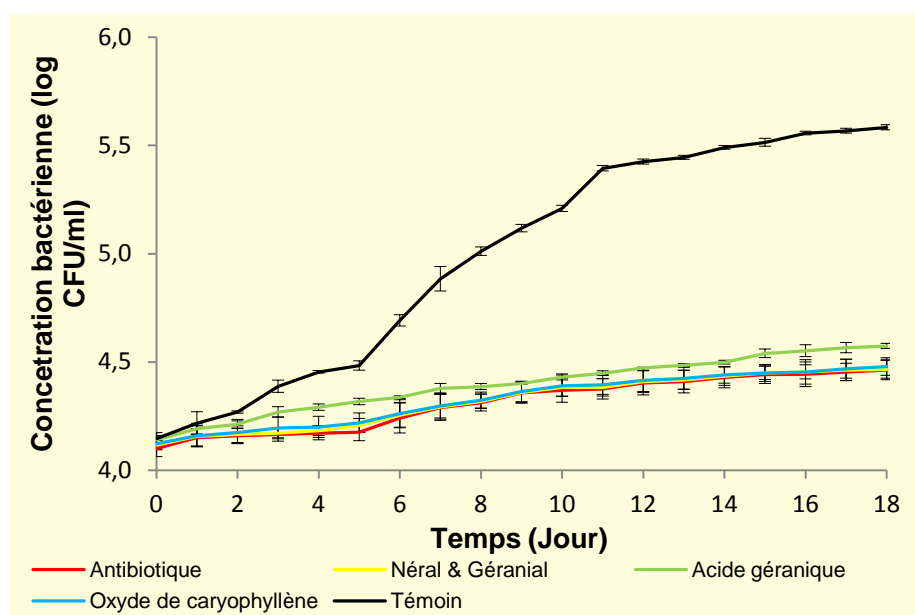


Figure 50 : Evolution de la concentration bactérienne (log CFU/ml) obtenue sur TCBS (*Vibrio* sp.) avec des larves traités par les huiles essentielles, antibiotique et témoin pendant 18 jours d'élevage (Valeurs correspondant à la moyenne de trois répétitions).

Pour mettre en évidence cette différence, le test de Kruskal Wallis a été utilisé. La matrice de données formée comme suit : 57 lignes (cycle de 18 jours = 19 fois trois répétitions) et 5 colonnes (3 huiles essentielles, 1 antibiotique et 1 témoin) (Annexe 22 : matrice de données).

a) Test de Kruskal Wallis sur la concentration en *Vibrio* sp.

Le tableau 55 donne le résultat du test de Kruskal Wallis

*Tableau 55 : Résultat du test de Kruskal Wallis sur la concentration en *Vibrio* sp.*

K (Valeur observée)	72,457
K (Valeur critique)	9,488
DDL	4
p-value (bilatérale)	< 0,0001
alpha	0,05

Etant donné que la p-value calculée (< 0,0001) est inférieure au niveau de signification $\alpha=0,05$, on doit rejeter l'hypothèse nulle H_0 , et retenir l'hypothèse alternative H_a (existe une différence significative entre la concentration bactérienne de chaque traitement) (Tableau 55).

b) Répartition des cinq traitements selon la concentration en *Vibrio* sp.

Le tableau 56 présente la répartition des cinq traitements selon la concentration bactérienne obtenue sur TCBS par la méthode de comparaison multiple par paires suivant la procédure de Dunn / Test bilatéral.

*Tableau 56 : Répartition des cinq traitements selon la concentration en *Vibrio* sp.*

Traitements	Groupes
Antibiotique	A
Néral & géraniel	A
Oxyde de Caryophyllène	A
Acide gérannique	B
Témoin	C

D'après ce tableau, il existe une différence significative entre la concentration bactérienne des prélèvements larvaires traités avec l'antibiotique, huiles essentielles et le témoin sans antibiotique ni huiles essentielles. Trois groupes ont été formés :

- le groupe A est formé par l'antibiotique, l'huile essentielle à néral et géraniol et l'huile essentielle à oxyde de caryophyllène. Ce groupe est caractérisé par sa plus haute potentialité à réduire la concentration bactérienne des larves que l'acide gérannique.
- le groupe B est formé par l'huile essentielle riche en acide gérannique. Ce groupe a la potentialité de réduire la concentration bactérienne des prélèvements larvaires mais n'est pas identique à celui du groupe A.
- le groupe C est formé par le témoin sans antibiotique ni huile essentielle.

En résumé, L'huile essentielle à néral et géraniol et celle à oxyde de caryophyllène qui ont un effet similaire à l'antibiotique, sont plus efficaces que l'huile essentielle à acide gérannique.

II.2.2. Evolution du taux de survie des larves pendant 18 jours d'élevage

La figure 51 montre l'évolution du taux de survie des larves dans les bacs traités avec les huiles essentielles, antibiotique et témoin pendant 18 jours d'élevage.

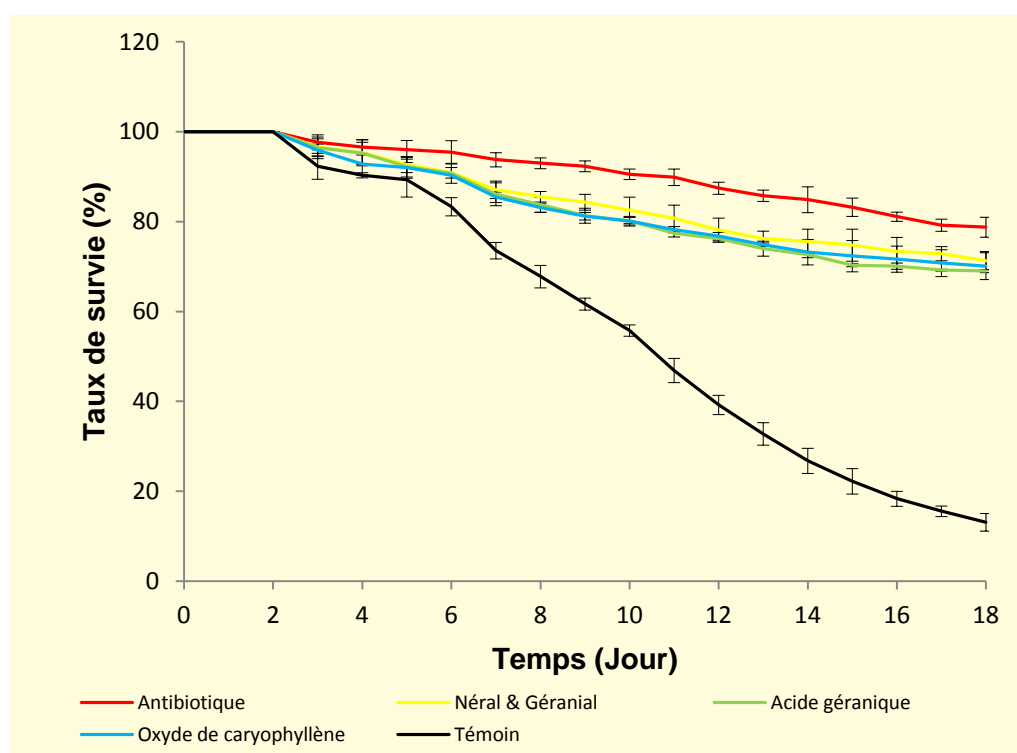


Figure 51 : Evolution du taux de survie des larves dans les bacs traités avec les huiles essentielles, antibiotique et témoin pendant 18 jours d'élevage (Valeurs correspondant à la moyenne de trois répétitions).

A la fin du cycle (J_{18}), les taux de survie des larves traitées avec l'antibiotique, l'huile essentielle à néral et géraniol, à oxyde de caryophyllène et à acide gérannique atteignent respectivement $78,78 \% \pm 2,22$; $71,33 \% \pm 2,03$; $70,11 \% \pm 2,99$; $69 \% \pm 0,33$; tandis que celui du témoin est de $13,11 \% \pm 1,95$.

Le test de Kruskal Wallis va permettre de voir s'il y a une différence significative entre le taux de survie des traitements. La matrice de données est formée comme suit : 57 lignes (cycle de 18 jours = 19 fois trois répétitions) et 5 colonnes (3 huiles essentielles, 1 antibiotique et 1 témoin) (Annexe 23 : matrice de données).

a) Test de Kruskal Wallis sur le taux de survie

Le tableau 57 donne le résultat du test de Kruskal Wallis

Tableau 57 : Résultat du test de Kruskal Wallis sur le taux de survie

K (Valeur observée)	41,496
K (Valeur critique)	9,488
DDL	4
p-value (bilatérale)	< 0,0001
alpha	0,05

Etant donné que la p-value calculée (< 0,0001) est inférieure au niveau de signification $\alpha=0,05$, on doit rejeter l'hypothèse nulle H_0 , et retenir l'hypothèse alternative H_a (existe une différence significative entre le taux de survie de chaque traitement) (Tableau 57).

b) Répartition des cinq traitements selon le taux de survie.

Le tableau 58 présente la répartition des cinq traitements selon le taux de survie par la méthode de comparaison multiple par paires suivant la procédure de Dunn / Test bilatéral.

Tableau 58 : Répartition des cinq traitements selon le taux de survie

Traitements	Groupes
Antibiotique	A
Acide gérannique	B
Oxyde de caryophyllène	B
Néral géraniol	B
Témoin	C

D'après le tableau 58 et la figure 51, il existe une différence significative entre le taux de survie des larves traitées avec l'antibiotique, huiles essentielles et le témoin sans antibiotique ni huiles essentielles. Trois groupes ont été formés :

- le groupe A est formé par l'antibiotique donnant un taux de survie élevé ($78,78 \% \pm 2,22$) ;
- le groupe B est formé par l'huile essentielle à acide gérannique, à caryophyllène oxyde et à néral et géraniol, respectivement de $71,33 \% \pm 2,03$; $70,11 \% \pm 2,99$ et $69 \% \pm 0,33$. Ce groupe donne un taux de survie plus élevé que le témoin.
- le groupe C est formé par le témoin sans antibiotique ni huile essentielle ($13,11 \% \pm 1,95$).

En résumé, même si les trois huiles essentielles ne donnent pas un taux de survie similaire à l'antibiotique, elles permettent néanmoins de maintenir ce taux, à un seuil acceptable ($> 69 \%$), taux bien plus élevée que le témoin.

II.3 Corrélation entre la concentration bactérienne (FMT et *Vibrio* sp.) et le taux de survie des larves

II.3.1. Corrélation entre la concentration en FMT et le taux de survie des larves

La figure 52 montre la corrélation entre la concentration en FMT et le taux de survie des larves

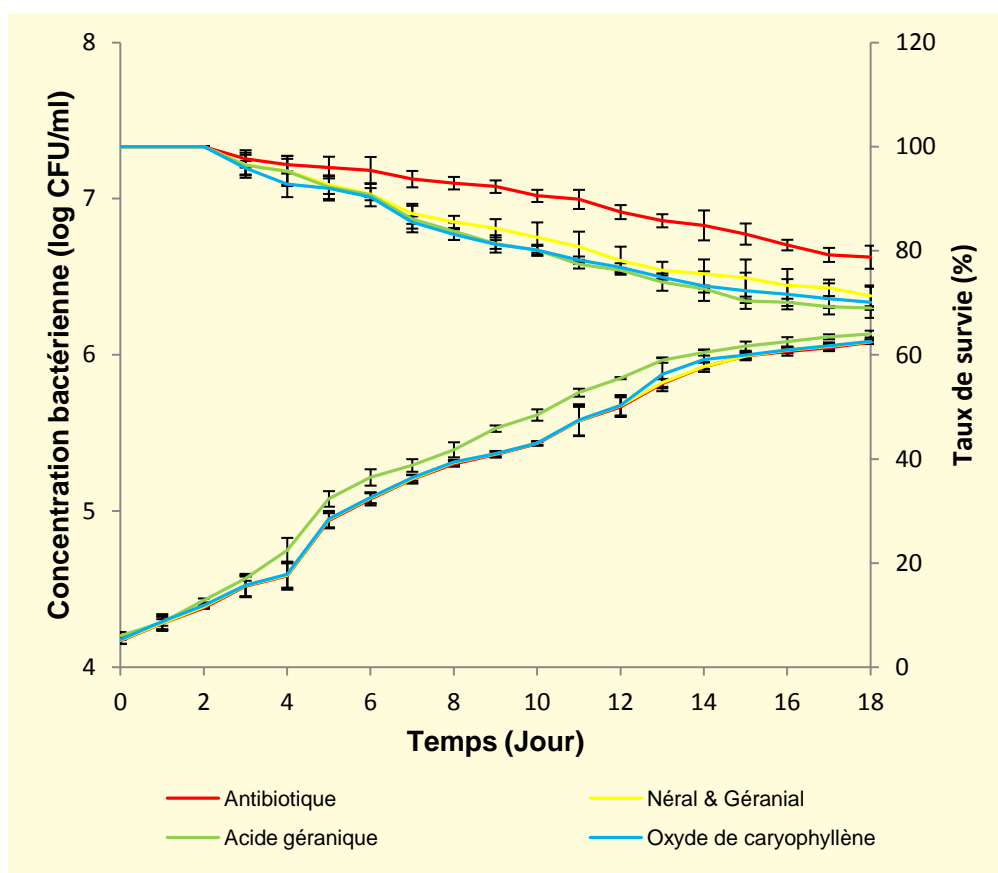


Figure 52 : Concentration en FMT et le taux de survie des larves

Le tableau 59 résume la corrélation entre la concentration en FMT et le taux de survie des larves.

Tableau 59 : Matrice de corrélation de Spearman (concentration en FMT et le taux de survie des larves)

	log CFU FMT	p-values
Taux de survie	Antibiotique	
Antibiotique	-0,977	< 0,0001
	Néral & géranial	
Néral et géranial	-0,976	< 0,0001
	Acide géranique	
Acide géranique	-0,988	< 0,0001
	Oxyde de caryophyllène	
Oxyde de caryophyllène	-0,989	< 0,0001

A tous les stades larvaires, une corrélation significativement négative entre la concentration en FMT et le taux de survie des larves a été observée.

II.3.2. Corrélation entre la concentration en *Vibrio* sp. et le taux de survie des larves

La figure 53 montre la concentration en *Vibrio* sp. et le taux de survie des larves pendant le cycle de développement larvaire (18 jours)

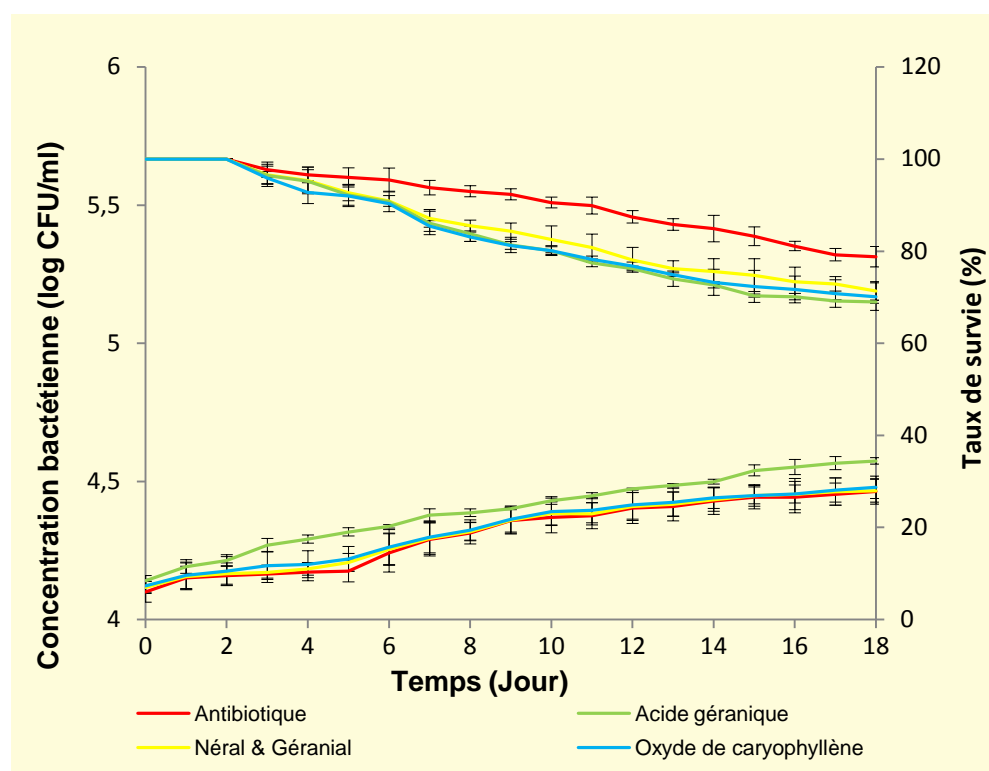


Figure 53 : Concentration en *Vibrio* sp. et le taux de survie des larves

Le tableau 60 résume la corrélation entre la concentration en *Vibrio* sp. et le taux de survie des larves.

Tableau 60 : Matrice de corrélation de Spearman (concentration en *Vibrio* sp. et le taux de survie des larves)

	log CFU <i>Vibrio</i> spp.	p-values
Taux de survie	Antibiotique	
Antibiotique	-0,897	< 0,0001
	Néral & géranial	
Néral & géranial	-0,923	< 0,0001
	Acide géranique	
Acide géranique	-0,986	< 0,0001
	Oxyde de caryophyllène	
Oxyde de caryophyllène	-0,948	< 0,0001

A tous les stades larvaires, une corrélation significativement négative entre la concentration en flore mésophile totale et le taux de survie des larves a été observée.

III. Discussions des résultats

Les souches isolées et identifiées dans les prélèvements larvaires sont en majorité représentées par la famille des Vibrionaceae. Cette famille fait partie de la flore autochtone des organismes marins et l'un des groupes les plus importants dans les environnements marins. Les principaux responsables des maladies bactériennes des larves de crevettes (*Penaeus monodon*, *P. vannamei*, *P. stylirostris* et *P. japonicus*) appartiennent à la famille des Vibrionaceae à gram -, comme *V. harveyi* et *V. vulnificus* (Song *et al.*, 1993a) *V. damsela* (Song *et al.*, 1993b) ou *V. penaeicidae* (Ishimaru *et al.*, 1995). D'après Liu *et al.* (1988) *Vibrio* sp. sont révélés comme souches responsables de la grande mortalité des crevettes.

Randrianarivelo *et al.* (2010) et Randrianarivelo *et al.* (2009) ont utilisé la méthode de microdilution en milieu liquide pour déterminer les CMI et les CMB. Dans notre cas, cette méthode a été adoptée car la plus faible CMI sera la concentration d'huile essentielle utilisée dans le traitement des bacs en éclosion de crevettes.

Les résultats de CMI et CMB montrent que les bactéries Gram + sont plus sensibles que les bactéries Gram -. Ces résultats sont comparables avec ceux de la littérature d'Abdelwahed *et al.* (2006), Carmen *et al.* (2007), Dubber *et al.* (2008) et Razafimamonjison *et al.* (2011b). Les bactéries Gram - possèdent une membrane externe qui joue un rôle de protection contre les éléments hydrophobes (Griffin *et al.*, 1999).

Dans tous les cas, la CMI de chaque chémotype est identique à celle à la CMB (effets bactéricides), sauf pour le chémotype IV (*C. fragrans*) vis-à-vis de *K. pneumoniae* et *E. faecalis* et pour le chémotype II (*C. madagascariensis*) vis-à-vis de *S. antarctica*, *E. faecalis* et *S. aureus*, dont la CMB est supérieure à la CMI (effets bactériostatiques). Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Randrianarivelo *et al.* (2009). Après les analyses statistiques (ANOVA), les quatre chémotypes de *C. fragrans* présentent des variations de la CMI vis-à-vis de tous les microorganismes testés ($P < 0.05$) : chémotype I (CMI: 0,16 à 2,5 mg/ml) \geq chémotype II (CMI: 0,31 à 2,5 mg/ml) \geq chémotype III (CMI: 0,31 à 10 mg/ml) $>$ chémotype IV (CMI : 0,63 à 10 mg/ml). Les huiles essentielles du chémotype I, II et III montrent une faible CMI que les deux derniers chémotype vis-à-vis des trois *Vibrio* spp. et *K. pneumonia*, dont la plus faible CMI (0,63 mg/ml) est observée sur *V. harveyi*. Une inhibition moyenne est observée sur *S. antarctica* (CMI : 5 mg/ml à 10 mg/ml). Pour les huiles essentielles de *C. madagascariensis*, le chémotype I est plus actif que le chémotype II, sauf pour *V. parahaemolyticus* et *S. aureus* dont la CMI du chémotype I est identique au CMI du chémotype II. D'après Pavithra *et al.* (2009a), en travaillant sur les huiles essentielles

de *Pamburus missionis*, l'activité antibactérienne est liée à la teneur en fraction monoterpénique. L'activité antibactérienne des trois premiers chémotypes (*C. fragans*) et le premier chémotype (*C. madagascariensis*) serait par conséquent due à la présence de β -pinène, sabinène (hydrocarbures monoterpéniques), 1,8 cinéole, linalol et ces dérivées, terpinène 4-ol, néral et géraniol (produits oxygénés monoterpéniques) dans les huiles essentielles. Pour d'autres plantes, Jirovetz *et al.* (2005), Magwa *et al.* (2006), Skocibusic *et al.* (2006b), Matasyoh *et al.* (2007), Bajpai *et al.* (2007), Tao *et al.* (2009) et Viuda-Martos *et al.* (2008b) ont montré que les principaux constituants responsables de l'activité antibactérienne sont carvacrol, thymol, citral, eugénol, 1,8 cinéole, limonène, pinène, linalol et ses précurseurs. Ces constituants exercent leurs effets cytotoxiques provoquant la rupture de la structure membranaire des bactéries et/ou inhibant la respiration des cellules microbiennes (Uribe *et al.*, 1985 ; Helander *et al.*, 1998). D'après Caillet *et al.* les huiles essentielles possèdent plusieurs modes d'action sur les différentes souches de bactéries, mais d'une manière générale leur action se déroule en trois phases : Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires ; acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure et destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

P. aeruginosa possède la plus haute valeur de CMI pour toutes les huiles essentielles testées (CMI>20mg/ml). Grâce à la rigidité de la structure membranaire, *P. aeruginosa* a été réputée par sa résistance vis-à-vis des huiles essentielles de différentes plantes: *Achillea holosericea* (Magiatis *et al.*, 1999), *Melaleuca alternifolia* (Cox *et al.*, 2000), *Salvia verbenaca* (Tawfeq, 2002), *Stachys sp.* (Skaltsa *et al.*, 2003), *Coriandrum sativum* (Matasyoh *et al.*, 2009) et *Cinnamosma* spp. (Razafimamonjison *et al.* 2011b).

Parmi les cinq composants purs, linalol (LIN), 1,8 cinéole (CIN) et citral (CIT) possèdent plus d'activité antimicrobienne que l'acide gérannique (GER) et l'oxyde de caryophyllène (CAR) vis-à-vis de toutes les souches testées. Ceci confirme aussi que les fractions monoterpéniques sont plus actives que les fractions sesquiterpéniques. En comparaison les huiles essentielles, les composants purs montrent une plus faible inhibition que les huiles essentielles vis-à-vis de toutes les bactéries. Par exemple, la CMI de chaque huile essentielle sur *V. harveyi*, *S. aureus* et *E. coli* est plus faible que celle des composants purs. Ainsi, les propriétés antibactériennes des huiles essentielles ne sont pas seulement dues au(x) composant(s) majeur(s) mais aux effets synergiques entre chaque constituant (Delaquis *et al.*, 2002; Dorman *et al.*, 2000 ; Razafimamonjison *et al.*, 2011b).

Plusieurs alternatives aux antibiotiques conventionnels ont été récemment utilisées en aquaculture de crevettes. Les extraits de plantes sont utilisés comme immunostimulants pour le renforcement de l'immunité de l'organisme hôte (Citarasu *et al.*, 2002; Direkbusarakom *et al.*, 1998; Dorman *et al.*, 2000; Yeh *et al.*, 2009). Les extraits de plantes ont été prouvés comme produits tonifiants et anti stress (Citarasu *et al.*, 2002). Randrianarivelo *et al.* (2010) ont montré que l'huile essentielle de *C. fragrans* riche en linalol (95,8 %) possède un effet similaire à l'érythromycine et est plus active que l'huile essentielle riche en 1,8 cinéole (71,6 %). L'huile essentielle de *C. fragrans* a un potentiel de contrôler la charge bactérienne dans les conditions *in vivo* et d'améliorer le taux de survie des larves de crevettes. Dans cette étude, les trois huiles essentielles (néral et géraniol, oxyde de caryophyllène et acide gérannique) possèdent un effet similaire à l'antibiotique pour réduire la charge en FTM des larves. Cependant, les trois huiles essentielles n'ont pas la même potentialité de réduire les charges en *Vibrio* sp.. L'huile essentielle à néral et géraniol et l'huile essentielle à oxyde de caryophyllène (effet similaire que l'antibiotique) sont plus efficaces que l'huile essentielle à acide gérannique. Par ailleurs, même si les trois huiles essentielles ne donnent pas un taux de survie similaire à celui de l'antibiotique (78,78 %), elles permettent néanmoins de maintenir ce taux, à un seuil acceptable (> 69 %), taux bien plus élevé que le témoin. Ces résultats témoignent la variation du pouvoir antimicrobien (CMI et CMB) des trois chémotypes déterminée *in vitro*.

IV. Conclusion partielle

Les bactéries Gram + sont plus sensibles que les bactéries Gram -. Les trois types d'huiles essentielles possèdent des effets bactéricides (CMI = CMB). Les quatre chémotypes de *C. fragrans* présentent des variations de la CMI vis-à-vis de tous les microorganismes testés: chémotype I (CMI: 0,16 à 2,5 mg/ml) \geq chémotype II (CMI: 0,31 à 2,5 mg/ml) \geq chémotype III (CMI: 0,31 à 10 mg/ml) $>$ chémotype IV (CMI : 0,63 à 10 mg/ml). Pour les huiles essentielles de *C. madagascariensis*, le chémotype I est plus actif que le chémotype II. Les composants purs montrent une plus faible inhibition que les huiles essentielles vis-à-vis de toutes les bactéries.

La plus faible DL 50 (872,11 mg/l) est observée au stade nauplii pour l'huile essentielle à chémotype néral et géraniel, tandis que la plus élevée (903,77 mg/l) est obtenue avec l'acide gérannique au stade post-larve. Les trois huiles essentielles ont un effet similaire à l'antibiotique pour réduire la charge en FMT des larves. L'huile essentielle à néral et géraniel et l'huile essentielle à oxyde de caryophyllène (effet similaire que l'antibiotique) sont plus efficaces que l'huile essentielle à acide gérannique vis-à-vis des *Vibrio* sp.. Les trois huiles essentielles donnent un taux de survie significativement différent de celui de l'antibiotique (78,78 %), mais elles permettent néanmoins de maintenir ce taux, à un seuil acceptable ($> 69\%$), taux bien plus élevé que le témoin (13%).

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Cette étude a permis d'approfondir la variabilité chimique des huiles essentielles de *C. fragrans* et *C. madagascariensis*. 47 arbres individuels répartis dans quatre zones d'étude ont été étudiés dans le but d'apprécier l'effet de la zone de collecte. 27 échantillons de feuilles de *C. fragrans* ont été collectés dans la partie ouest de Madagascar dans deux zones de la région de Boeny. 14 sont collectés dans un site sur le littoral qui se trouve à Katsepy appartenant au district de Mitsinjo (S15° 44' E46°14') et 13 proviennent de Tsaramandroso, un site qui se trouve à l'intérieur des terres, dans le district d'Ambatoboeny (S16°18'/E47°01'). 20 échantillons de *C. madagascariensis* proviennent de deux sites différents. 10 sont issus de la réserve spéciale d'Ambohitantely (S18°11'/E47°17'), sur le haut plateau et 10 ont été collectés dans l'aire protégée de Tampolo à l'est de Madagascar (S17°17'/E49°24').

Les 47 échantillons de feuilles sont soumis individuellement à l'hydrodistillation pendant trois heures, fournissant 47 échantillons d'huiles essentielles et qui sont ensuite analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CPG/SM). Les données chimiques obtenues ont été traitées par une série d'analyses statistiques : ACP (analyse en composantes principales), CAH (classification automatique hiérarchique) et AFD (analyse factorielle discriminante) qui ont permis de classer principalement les huiles essentielles dans quatre chémotypes distincts pour *C. fragrans* et deux chémotypes distincts pour *C. madagascariensis*.

- *C. fragrans* :

- le chémotype I est formé par 5 individus provenant de Tsaramandroso caractérisés par la forte teneur en linalol (90,47 %);
- le chémotype II ayant une teneur élevée en 1,8 cinéole (56,44 %) est constitué par 7 individus provenant de Katsepy ;
- le chémotype III rassemble 11 individus dont 7 provenant de Tsaramandroso et 4 provenant de Katsepy caractérisés par la richesse en géraniol (41,45 %) et néral (30,63 %);
- et le chémotype IV, caractérisé principalement par l'acide gérannique (48,75 %), est constitué par 4 individus dont 1 provenant de Tsaramandroso et 3 provenant de Katsepy.

- *C. madagascariensis* :
 - le chémotype I rassemble 09 individus provenant d'Ambohitantely et un individu provenant de Tampolo dont l'huile est caractérisée par la forte teneur en oxyde de caryophyllène (26,60 %);
 - le chémotype II, caractérisé par la richesse en 1,8 cinéole (30,89 %), est constitué par 10 individus (09 provenant de Tampolo et un provenant d'Ambohitantely).

La répartition en quatre chémotypes pour les huiles essentielles de *C. fragrans* et en deux chémotypes pour les huiles essentielles de *C. madagascariensis* n'est pas liée à la zone de collecte. En effet, on remarque la présence, au moins de deux chémotypes différents, dans un même site. Par exemple, le chémotype III (néral et géraniol) et le chémotype IV (acide gérannique), de l'huile essentielle de *C. fragrans* ont été déterminés en même temps à Tsaramandroso et à Katsepy.

La couleur des huiles essentielles de *C. fragrans* pour chaque chémotype varie de incolore au jaune foncé. Le chémotype I présente un rendement (v/p : ml/100 g de MS) moyen élevé, de l'ordre de 5,5 %, tandis que le chémotype IV donne un rendement faible, de l'ordre de 3,1 %. L'huile essentielle de *C. fragrans* est plus légère que celle de l'eau. La densité relative varie de 0,8663 à 0,8998. L'indice de réfraction entre les chémotypes oscille entre 1,4510 et 1,5517. Pour *C. madagascariensis* les huiles essentielles du chémotype I sont incolores, tandis que les huiles essentielles du chémotype II sont de couleur blanchâtre. Le chémotype II donne un rendement moyen élevé, de l'ordre de 2,23 % tandis que le chémotype I présente un rendement faible, de l'ordre de 1,35 %. L'indice de réfraction entre les chémotypes varie de 1,4562 à 1,4699.

L'incidence de la date de récolte sur la composition chimique des huiles essentielles de *C. fragrans* et *C. madagascariensis* ont été aussi évaluée. Deux arbres pour chaque chémotype identifié, ont été choisis et soumis aux prélèvements réguliers à des dates déterminées dans l'année (d'avril 2008 à décembre 2009). En général, le rendement en huile essentielle varie au cours de l'année. Cependant, pour chaque chémotype, la composition chimique des huiles extraites reste invariable.

Après avoir montré que la zone et les dates de collecte ne sont pas susceptibles de perturber la composition chimique de *C. fragrans* et *C. madagascariensis*, nous avons déterminé s'il y a similarité et/ou différence entre la composition chimique de l'huile essentielle de *C. fragrans* et *C. madagascariensis* dans un but de chimio taxonomie. En effet, l'huile essentielle de *C. fragrans* est distinguée par la forte teneur en néral et géraniol et acide gérannique que l'huile essentielle de *C. madagascariensis* dont le composant majeur est l'oxyde de caryophyllène et l'oxyde de humulène.

La variabilité chimique des huiles essentielles de *Cinnamosma* sp. explique la variabilité observée sur l'activité antimicrobienne des huiles des différents chémotypes vis-à-vis des souches de références et les souches isolées de l'écloserie. Les résultats montrent que les bactéries gram + sont plus sensibles que les bactéries gram -. Dans tous les cas la CMI de chaque chémotype est identique à celle de CMB (effets bactéricides), sauf pour le chémotype IV (*C. fragrans*) vis-à-vis de *K. pneumoniae* et *E. faecalis* et pour le chémotype II (*C. madagascariensis*) vis-à-vis de *S. antarctica*, *E. faecalis* et *S. aureus*, dont la CMB est supérieure à la CMI (effets bactériostatiques). Après les analyses statistiques (ANOVA), les quatre chémotypes de *C. fragrans* présentent des variations de la CMI vis-à-vis de tous les microorganismes testés ($P < 0.05$) : chémotype I (CMI: 0,16 à 2,5 mg/ml) \geq chémotype II (CMI: 0,31 à 2,5 mg/ml) \geq chémotype III (CMI: 0,31 à 10 mg/ml) $>$ chémotype IV (CMI : 0,63 à 10 mg/ml). Les huiles essentielles du chémotype I, II et III montrent une faible CMI que les deux derniers chémotypes vis-à-vis des trois *Vibrio* sp. et *K. pneumonia*, dont la plus faible CMI (0,63 mg/ml) est observée sur *V. harveyi*. Pour les huiles essentielles de *C. madagascariensis*, le chémotype I est plus actif que le chémotype II, sauf pour *V. parahaemolyticus* et *S. aureus* dont la CMI du chémotype I est identique au CMI du chémotype II. *P. aeruginosa* possède la plus haute valeur de CMI pour tous les chémotypes testés (CMI > 20 mg/ml).

La relation entre les constituants des huiles essentielles des deux *Cinnamosma* sp. et l'activité antimicrobienne ont été aussi mis en évidence en testant sur les 14 souches des composants purs : linalol (LIN), 1,8 cinéole (CIN), citral (CIT), oxyde de caryophyllène (CAR) et acide gérannique (GER). En effet, le linalol, le 1,8 cinéole et le citral possèdent plus d'activité antimicrobienne que l'acide gérannique et l'oxyde caryophyllène vis-à-vis de toutes les souches testées. En comparaison les huiles essentielles, les composants purs montrent une faible inhibition que les huiles essentielles vis-à-vis de toutes les bactéries.

La toxicité (DL 50) ainsi que l'effet des trois huiles essentielles (néral et géraniol, oxyde de caryophyllène et acide gérannique) sur le taux de survie des larves et la concentration bactérienne des prélèvements larvaires ont été évalués. La plus faible DL 50 (872,11 mg/l) est observée au stade nauplii pour l'huile essentielle à chémotype néral et géraniol, tandis que la plus élevée (903,77 mg/l) est obtenue avec l'acide gérannique au stade post-larve. Les trois huiles essentielles ont un effet similaire à celui de l'antibiotique de réduire la charge en FMT des prélèvements larvaires. L'huile essentielle à néral et géraniol et l'huile essentielle à oxyde de caryophyllène (effet similaire à celui de l'antibiotique) sont plus efficace que l'huile essentielle à acide gérannique vis-à-vis des *Vibrio sp.*. De même, les trois huiles essentielles ne donnent pas un taux de survie similaire à celui de l'antibiotique (78,78 %), mais elles permettent néanmoins de maintenir ce taux, à un seuil acceptable (> 69 %) que le témoin dont le taux de survie n'est que 13 % à J₁₈.

Les différents résultats montrent que les huiles essentielles de *C. fragrans* et *C. madagascariensis* constituent une alternative aux antibiotiques en aquaculture de crevette. Cependant, nombreuses études sont toujours à découvrir sur le genre *Cinnamosma* et ses huiles essentielles :

- Les expérimentations en aquaculture de crevettes ont été effectuées dans des bacs de 20 litres. Des tests en grand volume seraient nécessaires afin de vérifier et confirmer que les huiles essentielles de *C. fragrans* et *C. madagascariensis* constituent une nouvelle alternative aux antibiotiques en aquaculture de crevettes.
- L'élaboration d'une fiche technique sur les huiles essentielles des différents chémotypes de cette espèce afin d'aider les producteurs à produire des huiles chémotypées et à orienter les utilisateurs potentiels.
- La maîtrise des autres facteurs de variabilités (mode de distillation, cinétique d'extraction, effet de séchage, partie de la plante) de la composition chimique des huiles est primordiale pour la certification.
- L'élaboration d'un cahier de charge pour la production des huiles essentielles de *Cinnamosma* spp.. La distillation des feuilles avec les rameaux et les tiges pourrait être réalisée, à condition de ne pas nuire à la qualité de l'huile, évitera un gaspillage de matières végétales.

- L'établissement d'une carte de distribution spatiale des chémotypes dans les aires de distribution du genre *Cinnamosma* afin d'aider les collecteurs et les exploitants de ne récolter que les chémotypes recherchés et donc présentant une plus-value.
- La constitution de banques de graines et de plantations conservatoires apparaît certainement nécessaire pour la préservation des ressources génétiques.
- La constitution de pépinières en vue d'une culture en petite exploitation agricole, de l'enrichissement de la forêt ou d'un reboisement à partir des graines ou boutures chémotypées.
- Les propriétés antiseptiques, anticancérigènes et antitumeurs des huiles essentielles du genre *Cinnamosma* doivent être aussi réalisées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdelwahed A., Hayder N., Kilani S., Mahmoud A., Chibani J., Hammami M., Chekir-Ghedira L.; Ghedira K. (2006) Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Tunisian *Pituranthos tortuosus* (Coss.) Maire. *Flavour Fragr. J.* **21** :129 - 133.

AFNOR. (2000) *Recueil des normes françaises huiles essentielles*, tome 2 **1** :79 - 86.

AFNOR. (2001) *Huiles essentielles Tome 1. Echantillonnage et méthodes d'analyse* : 471 p.

Ahmed A.K.; Johnson K.A. (2000) Horticultural development of Australian native edible plant. *Austr. J. Bot.* **48** : 417 - 426.

Andrianoelisoa H.S. (2008) *Etude de la variabilité des huiles essentielles de Ravensara aromatica Sonnerat. Prescription pour une gestion durable de cette espèce endémique malgache. Thèse, département Sciences Chimique, Ingénierie moléculaire, Université de Montpellier II, Sciences et technique de Languedoc* : 205 p.

Andrianoelisoa H.S., Menut C., Collas-de-Chatelperron P., Saracco J., Ramanoelina P.; Danthu P. (2006) Intraspecific chemical variability and highlighting of chemotypes of leaf essential oils from *Ravensara aromatica* Sonnerat, a tree endemic to Madagascar. *Flavour Fragr. J.* **21** : 833 - 838.

Arnal-Schnebelen B., Behra O., Rakotoarison C., Escoubas J.; Danthu P. (2007) Applications en gynécologie de l'huile essentielle de *Cinnamosma fragrans* Baillon (commercialisée sous le nom de « Saro »). *Phytothérapie* **5** : 73 - 75.

Avalle O. (1994) *Manuel d'écloserie: Ferme pilote d'aquaculture de crevette de Nossi-Bé. Projet FAO/MAG/88/006* : 40 p.

Azevedo N.R., Campos I.F.P., Ferreira H.D., Portes T.A., Santos S.C., Seraphin J.C., Paula J.R.; Ferria P.H. (2001) Chemical variability in the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Phytochemistry* **57** : 733 - 736.

Bachère E. (2000) Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture* **191** : 3 - 11.

Bachère E., Destoumieux; Delphine B.P. (2000) Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. *Aquaculture* **191** : 71 - 88.

Bajpai V.K., Rahman A.; Kang S.C. (2007) Chemical composition and anti-fungal properties of the essential oil and crude extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *Industrial Crops and Products* **26** : 28 - 35.

Beaumont A.; Cassier P. (1981) *Biologie animale des protozoaires aux métazoaires épithélioneuriens*. 3ème édition, Bordas, Dunod Université : 459 p.

Bekhechi C., Atik-Bekkara F.; Abdelouahid D.E. (2008) Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d' *Origanum glandulosum* d'Algérie. *Phytothérapie* **6** : 153 - 159.

Billerbeck V.G. (2007) Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie* **5** : 249 - 253.

Björklund H., Bergh R.; Bylund G. (1991) Residues of oxolinic acid and oxytetracycline in fish and sediments from fish farms. Thesis, Björklund, H. Oxytetracycline and oxolinic acid as antibacterials in aquaculture - analysis, pharmacokinetics and environmental impacts. Department of Biology, Åbo Akademi University, Finland: 245 p.

Bosser H. (1980) *Elevage des crevettes pénéidés*. Toulouse: UT 107 : 134 p.

Bousquet A. (1972) *Plantes médicinales du Congo Brazzaville: Uvariopsis pauciflora, Diospyros*. Paris: 125 p.

Brophy J.J., Goldsack R.J., Forster P.I., Bean A.R., Clarkson J.R.; Lepschi B.J. (1998) Leaf Essential Oils of the Genus *Leptospermum* (Myrtaceae) in Eastern Australia. Part 1. *Leptospermum brachyandrum* and *Leptospermum pallidum* Groups. *Flavour Fragr. J.* **13** :19 - 25.

Bruneton J. (1987) *Éléments de phytochimie et de pharmacognosie*. Tec et Doc, Lavoisier, Paris:230 p.

Bruneton J. (1999) *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales*,. 3ème Edition Tec et Doc, Lavoisier Paris : 1120 p.

Caillet S.; Lacroix M. *Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire*. Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) INRS-Institut Armand-Frappier : 8 p.

Caille F.; Pages J.P. (1996) *Introduction à l'analyse des données*, Smash, Paris : 90 p.

Capone D.G., Weston D.P., Miller V.; Shoemaker C. (1996) Antibacterial residues in marine sediments and invertebrates following chemotherapy in aquaculture. *Aquaculture* **145** : 55 - 75.

Carmen F., Mignola E., Rigano D., Senatore F., Bellone G., Bruno M.; Rosselli S. (2007) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from aerial parts of *Micromeria fruticulosa* (Bertol.) Grande (Lamiaceae) growing wild in Southern Italy. *Flavour Fragr. J.* **22** : 289 - 292.

Cavaleiro C., Salgueiro L.R., da-Cunha A.P., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Bighelli A.; Casanova J. (2003) Composition and variability of the essential oils of the leaves and berries from *Juniperus navicularis*. *Biochemical Systematics and Ecology* **31** : 193 - 201.

Chiasson H.; Beloin N. (2007) Les huiles essentielles des biopesticides nouveau genre. *Bulletin de la société d'entomologie du Québec Antennaea* 14 (1).

Citarasu T., Babu M.M., Sekar R.R.J.; Marian M.P. (2002) Developing Artemia enriched herbal diet for producing quality larvae in *Penaeus monodon*, Fabricius. *Asian Fish Sci.* **15** : 21 - 32.

Cole R.A., Haber W.A., Lawton R.O.; Setzer W.N. (2008) Leaf Essential Oil Composition of Three Species of *Myrcianthes* from Monteverde, Costa Rica. *Chem. and Bio.* **5** : 1327 - 1331.

Coronel A.C., Cerda-García-Rojas C.M., P.Joseph-Nathan; Catalán C.A.N. (2006) Chemical composition, seasonal variation and a new sesquiterpene alcohol from the essential oil of *Lippia integrifolia*. *Flavour Fragr. J.* **21** : 839 - 847.

Cox S.D., Mann C.M.; Markham J.L. (2000) Determining the antimicrobial actions of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* **88** : 170 - 175.

Croteau F. (1986) Biochemistry of monoterpenes and sesquiterpenes of the essential herbs: species and medicinal plants. *Recent advances in botany, horticulture and pharmacology*, Craken, Simo, Oryx Press. Phenix, Vol 1.

Dagnelie P. (1986) *Théorie et méthodes statistiques*. Les Presses Agronomiques de Gembloux. Gembloux **2** : 361 - 375.

Delaquis P.J., Stanich K., Girard B.; Mazza G. (2002) Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of Dill, Cilantro, Coriander and Eucalyptus essential oils. *International J. Food Microbiol.* **74** : 101 - 109.

Diday E., Lemaire J., Pouget J. (1985) *Eléments d'analyses des données*, Dunod, Paris, 464 p.

Direkbusarakom S., Ezura Y., Yoshimizu M.; Herunsalee A. (1998) Efficacy of Thai traditional herb extracts against fish and shrimp pathogenic bacteria. *Fish Pathol.* **33** : 437 - 441.

Dorman H.J.D.; Deans S.G. (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* **88** : 308 - 316.

Dubber D.; Harder T. (2008) Extracts of *Ceramium rubrum*, *Mastocarpus stellatus* and *Laminaria digitata* inhibit growth of marine and fish pathogenic bacteria at ecologically realistic concentrations. *Aquaculture* **274** : 196 - 200.

EJF. (2003) *Risky Business: Vietnamese Shrimp Aquaculture - Impacts and Improvements*. London, UK7 Environmental Justice Foundation : 44 p.

FAO. (2005). *Fisheries Technical Paper*. No. 469. Rome. Italy: 97 p.

Flegel T.W. (2006) Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture* **258** : 1 - 33.

Gancel A.L., Ollitrault P., Froelicher Y., Tomi F., Jacquemond C., Luro F.; Brillouet J.M. (2005) Leaf volatile compounds of six citrus somatic allotetraploid hybrids originating from various combinations of lime, lemon, citron, Sweet orange and grapefruit. *J. Agr. Food Chem.* **53** : 2224 - 2230.

Gattefossé M. (1921) *Les végétaux aromatiques de Madagascar*. *Agronomie coloniale* **46** : 113.

Gesamp. (1997) *Joint group of experts on the scientific aspects of marine environmental protection. Towards safe and effective use of chemicals in coastal aquaculture. Reports and studies No 65*, Rome. Italy, FAO : 40 p.

Griffin S.G.; Wyllie S.G. (1999) The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour Fragr. J.* **14** : 322 - 332.

Guenther E. (1984) *The essential oils: history, origin in plants, production and analysis*. Robert E. Krieger Publishing Company, Malabar, FL, USA :Vol 1.

Hansen P.K., Lunestad B.T.; Samuelsen O.B. (1992) *Effects of oxytetracycline, oxolinic acid, and flumequine on bacteria in an artificial marine fish farm sediment*. *Can. J. Microbiol.* **38** : 1307 - 1312.

Harinantenaina L.; Takaoka S. (2006) *Cinnafragrins A-C: dimeric and trimeric drimane sesquiterpenoids from Cinnamosma fragrans, and structure revision of capsicodendrin*. *J. Nat. Prod.* **69** : 1193 - 1197.

Harinantenaina L., Asakawa Y.; Clercq E. (2007) *Cinnamacrins A-C, Cinnafragrin D, and cytostatic metabolites with alpha-glucosidase inhibitory activity from Cinnamosma macrocarpa*. *J. Nat. Prod.* **70** : 277 - 282.

Harinantenaina L., Katsuyoshi M., Hideaki O., Masatoshi K., Kentaro Y.; Yoshinori A. (2008) *Secondary metabolites of Cinnamosma madagascariensis and their alpha-glucosidase inhibitory properties*. *J. Nat. Prod.* **71** : 123 - 126.

Hektoen H., Berge J.A., Hormazabal V.; Yndeslad M. (1995) *Persistence of antibacterial agents in marine sediments*. *Aquaculture* **133** : 175 - 84.

Helander I.M., Hanna-Leena A., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E.J., Leon G.M.G.; vonWright A. (1998) *Characterization of the action of selected essential oil components on gram negative bacteria*. *J. Agr. Food Chem.* **46** : 3590 - 3595.

Herwig R.P., Gray J.P.; Weston D.P. (1997) *Antibacterial resistant bacteria in surficial sediments near salmon net-cage farms in Puget Sound, Washington*. *Aquaculture* **149** : 263 - 283.

Hillig K.W. (2004) *A chemotaxonomic analysis of terpenoid variation in Cannabis*. *Biochemical Systematics and Ecology* **32** : 875 - 891.

Hirsch R., Ternes T., Haberer K., Kratz; Karl-Ludwig. (1999) *Occurrence of antibiotics in the aquatic environment*. *Sci Total Environ* **225** : 109 - 118.

Holmoström K., Gräslund S., Wahlström A., Pongshompoo S., Bengtsson B.E.; Kautsky N. (2003) *Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health*. *Int J Food Sci Technol* **38** : 255 - 66.

Hsiao J.Y.; Lin M.L. (1995) A chemotaxonomic study of essential oils from the leaves of genus *Clerodendrum* (Verbenaceae) native to Taiwan. *Bot. Bull. Acad. Sin* **36** : 247 - 251.

Humbert H. (1954) *Flore de Madagascar et des Comores*, 130ème famille : Canellacées; Paris pp 46 - 52.

Immanuel G., Vincybai V.C., Sivaram V., Palavesam A.; Marian M.P. (2004) Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Panaeus indicus* juveniles. *Aquaculture* **236** : 53 - 65.

Ireland B.F., Hibbert D.B., Goldsack R.J., Doran J.C.; Brophy J.J. (2002) Chemical variation in the leaf essential oil of *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake. *Biochemical Systematics and Ecology* **30** : 457 - 470.

Ishimaru K., Akagawa-Matsushita M.; Muroga K. (1995) *Vibrio penaeicidae* sp. nov., a pathogen of Kuruma prawns (*Penaeus japonicus*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45** : 134 - 138.

Jirovetz L., Buchbauer G., Stoyanova A.S., Georgiev E.V.; Damianova. S.T. (2005) Composition, quality control and antimicrobial activity of the essential oil of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds from Bulgaria. *Int. J. Food Sci. Technol.* **40** : 305 - 310.

Kautsky N., Rönnbäck P., Tedengren M.; M.Troell. (2000) Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture* **191** : 145 -161.

Kasprzyk K. (2002) *Crevetticulture responsable*, Actes de Conférence, Edition Océan Consultant, 345 p.

Kayser O., Latté K., Kolodziej H.; Hammerschmidt F.J. (1998) Composition of the essential oils of *Pelargonium sidoides* DC. and *Pelargonium reniforme* Curt. *Flavour Fragr. J.* **13** : 209-212.

Keskitalo M., Angers P., Earle E.; Pehu E. (1999) Chemical and genetic characterization of calli derived from somatic hybridization between tansy (*Tanacetum vulgare* L.) and pyrethrum (*Tanacetum cinerariaefolium*). *Theoretical and Applied Genetics* **98** : 1335 - 1643.

Le T.X., Munekage Y., Phan D., Anh T., Quan D.; Quynh T. (2003) The environmental quality of shrimp ponds in mangrove areas. *Proceedings of the Thirteenth. International Offshore and Polar Engineering Conference Honolulu, HI, USA, May 25–30; ISSN :1098-6189 (set)1-880653-60-5 (set): pp 255 - 262.*

Leano E.M., Xi Y.C.; Liao I.C. (2007) Effects of steiva extract on growth, non-specific immune response and disease resistance of grass prawn, *Penaeus monodon* (Fabricius), juveniles. *J Fish Soc Taiwan* **34** : 165 - 175.

Lebart L., Morineau A.; Piron M. (1997) *Statistique exploratoire multidimensionnelle*. 2ème édition. Dunod Paris : pp 246 - 250.

Lespagne C. (1992) Définition, objet, historique et bibliographie de l'analyse multivariée des données statistiques : 4 p.

Liang Q., Liang Z.S., Wang J.R.; Wen-Hui X. (2009) Essential oil composition of *Salvia miltiorrhiza* flower. *Food Chem.* **113** : 592-594.

Liu C.I.; Chen M.S. (1988) Experimental infection of *Vibrio* sp. to induce shell disease in grass shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). *Int. Fish Health Conf., Fish Health Section, AFS, Vancouver*, : 215 p.

Lukas B., Schmiderer C., Franz C.; Novak J. (2009) Composition of essential oil compounds from different syrian Populations of *Origanum syriacum* L. (Lamiaceae). *J. Agr. Food Chem.* **57** : 1362-1365.

Lunestad B.T., Samuelsen O.B., Fjelde S.; Ervik A. (1995) Photostability of eight antibacterial agents in seawater. *Aquaculture* **134** : 17 - 25.

Magiatis P., Meliou E., Skaltsounis A.L., Chinou I.; Mitaku S. (1999) Composition and anti-microbial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var. *chia*. *Book of abstracts: 2000 years of natural products research-past present and future*. Amsterdam: Leiden University : 622 p.

Magwa M.L., Gundidza M., Gwerua N.; Humphrey G. (2006) Chemical composition and biological activities of essential oil from the leaves of *Sesuvium portulacastrum*. *Journal of Ethnopharmacology* **103** : 85 - 89.

Matasyoh J.C., Kiplime J.J., Karubiu N.M.; Hailstorks T.P. (2007) Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Tarchonanthus camphorates*. *Food Chem.* **101** : 1183 - 1187.

Matasyoh J.C., Maiyo Z.C., Ngure R.M.; Chepkorir R. (2009) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. *Food Chem.* **113** : 526-529.

Microsoft. (2003) *Dictionnaire encyclopédie Encarta sur CD-ROM*. Microsoft Corporation.

Milijaona R., Rasidimanana V., Rabarison H., Cheplogoi P.K., Ratsimbason M.; Mulholland D.A. (2003) Plant traditionnally prescribed to treat tazo(malaria) region of Madagascar. *Malaria J.* **2** : 25.

Milos M., Radonic A., Bezic N.; Dunkic V. (2001) Localities and seasonal variations in the chemical composition of essential oils of *Satureja montana* L. and *S. cuneifolia* Ten. *Flavour Fragr. J.* **16** : 157 - 160.

Miranda C.D.; Zemelman R. (2002) Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. *Aquaculture* **212** : 31 - 47.

Motoh L. (1981) *Studies on the fisheries biology of the giant tiger prawn-P. monodon in Philippines; Tech report n° 7*. Aquaculture departement; Southeast Asian fisheries.

Neng-guo T., Yue-jin, Liu, Miao-ling; Zhang. (2009) Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil from the peel of bingtang sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *Int. J. Food Sci. Technol.* **44** : 1281 - 1285.

Nygaard K., Lunestad B.T., Hektoen H., Berge J.A.; Hormazabal V. (1992) Resistance to oxytetracycline, oxolinic acid and furazolidone in bacteria from marine sediments. *Aquaculture* **104** : 31 - 36.

Paris R.R.; Moyse H. (1976) *Matière médicale*. Masson Paris : 36 p.

Pavithra P.S., Sreevidya N.; Verma S. (2009) Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of *Pamburus missionis*. *Journal of Ethnopharmacology* **124** : 151 - 153.

Pernet R.; Meyer G. (1957) *Pharmacopée de Madagascar*. Institut de Recherche Scientifique Tananarive, Tananarive-Tsimbazaza, p 86.

Perrier de la Bâthie H. (1923) Sur les quelques plantes à parfum de Madagascar. *Bulletin économique de Madagascar*, 1er trimestre: 210 p.

Perrier de la Bâthie H. (1954) Canellacées. In Humbert (Ed.). *Flore de Madagascar et des Comores*, Paris, 138 : pp 1 - 11

Pharmacopée-Française. (1985) Edition 4 - 5 - 8. Maisonneuve, Paris.

Pouliquen H., Le-Bris; Chemosphere. (1996) Sorption of Oxolinic acid and oxytetracycline to marine sediments. *Aquaculture* **33** : 801 - 815.

Primavera J. (1980) Courtship and mating behaviour in *Penaeus monodon fabricius* (Decapoda, Nantatia), cructaceana *Aquaculture* **112** : 11 - 13.

Rabelohataona T.N. (2007) Contribution à l'étude de l'effet saison sur la composition chimique des huiles essentielles de *Cinnamosma fragrans* et *Cinnamosma madagascariensis*. Mémoire de fin d'études d'Ingéniorat. ESSAgronomiques. Département Industries Agricoles et Alimentaires : 90 p.

Rakotovao L.H.; Randrianjohany E. (1996) Origine et répartition bioécologique des plantes aromatiques de Madagascar. In : Lourenço, W.R., Ed. *Biogeography of Madagascar*. Paris : 187 p.

Ranaivoarisoa S. (2000) Contribution à l'étude qualitative et quantitative des constituants du *Cinnamosma fragrans* Baillon et du *Cinnamosma madagascariensis* Danguy "MANDRAVASAROTRA". Mémoire de fin d'études d'Ingéniorat. ESSAgronomiques. Département Industries Agricoles et Alimentaires : 156 p.

Ranaivosoa B. (2006) Diversité interspécifique des constituants chimiques des huiles essentielles de *Cinnamosma*, plantes endémiques de Madagascar. Mémoire de DEA. ESSAgronomiques. Département Eaux et Forêts : 134 p.

Randrianalijaona J.A. (2003) Contribution à la caractérisation chimique de l'huile essentielle de *Lantana camara* (fleurs et parties aériennes) de Madagascar: Variétés, Variabilité, . Thèse docteur ingénieur, département Industries Agricoles et Alimentaires. ESSAgronomiques, Univrsité d'Antananarivo : 165 p.

Randrianarivelo R., Danthu P., Benoit C., Ruez P., Raherimandimby M.; Sarter S. (2010) Novel alternative to antibiotics in shrimp hatchery: effects of the essential oil of *Cinnamosma fragrans* on survival and bacterial concentration of *Penaeus monodon* larvae. *J. Appl. Microbiol.* **109** : 642-650.

Randrianarivelo R., Sarter S., Odoux E., Brat P., Lebrun M., Romestand B., Menut C., Andrianoelisoa H.S., Raherimandimby M.; Danthu P. (2009) Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. *Food Chem.* **114** : 680-684.

Rasendra H.P. (1994) Contribution à l'étude de la composition chimique de l'huile essentielle de feuilles de *Cinnamosma madagascariensis*. Mémoire de DEA de chimie organique, option "Produits naturels", Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo:120 p.

Rasoanaivo P.; De-la-Gorge P. (1998) Essentials oils of economic value in Madagascar. *Herbal Gram.* **43** : 31 - 59.

Ravoninahitra-Ravalison H.A. (2005) Contribution à l'étude de la variabilité de la composition chimique de l'huile essentielle de *Cinnamosma fragrans* dans l'ouest de Madagascar. Mémoire de fin d'études d'Ingéniorat. ESSAgronomiques. Département Industries Agricoles et Alimentaires : 66 p.

Razafimamonjison D. G., Danthu P., Lebrun M., Rabelohataona T., Sarter S., Ramanoelina P. (2011a) Variability of the essential oil compositions of *Cinnamosma fragrans* and *Cinnamosma madagascariensis*, endemic plants from Madagascar. Sous presse dans *Flavour Fragr. J.* **IF: 1,266**

Razafimamonjison D. G., Danthu P., Ramanoelina P., Petit T., Sarter S. (2011b) Antimicrobial activity of *Cinnamosma fragrans* and *Cinnamosma madagascariensis* essential oils. Sous presse dans *Food Chem.* **IF: 3,146**

Razafindrazaka A.S. (1997) Test de performance zootechnique d'un aliment de crevettes produit par TIKO, cas de la ferme AQUALMA, Mahajamba. Mémoire de fin d'étude d'Ingéniorat ESSAgronomiques, Département Elevage, Université d'Antananarivo : 135 p.

Razanamparany L.A. (2005) Etude prospective des essences aromatiques de la forêt de Tsianimpihy-Antsalova. Mémoire de fin d'études d'Ingéniorat. ESSAgronomiques. Département Industries Agricoles et Alimentaires : 89 p.

Ribnicky D.M., Poulev A., O'Neal J., Wnorowski G., Malek D.E., Jager R.; Raskin I. (2004) Toxicological evaluation of ethanolic extract of *Artemisia dracunculus* L. for use as dietary supplement and in functional foods. *Food Chem. Toxicol.* **42** : 585 - 598.

Rice E. L. (1984) *Allelopathy*. 2nd ed. GB-London, Academic press : 40 p.

Roulier G. (1990) *Les huiles essentielles pour votre santé*. 2ème édition, Ed. Dangles, St-Jean-de Braye : 336 p.

Rout P.K., Rao Y.R., Sree A.; Naik S.N. (2007) Composition of essential oil, concrete, absolute, wax and headspace volatiles of *Murraya paniculata* (Linn.) Jack flowers. *Flavour Fragr. J.* **22** : 352 - 357.

Salle J.L. (1991) *Les huiles essentielles, Synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie*. Ed. Frison-Roche, Paris : 167 p.

Saulnier D., Haffner P., Goarant C., Levy P.; Ansquer D. (2000) Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture* **191** : 133 - 144.

Schulte V.K.E., Rücker G.; Lewe W.A. (1972) Über die inhaltsstoffe von *Cinnamosma fragrans* Baillon-einer arzneipflanze aus Madagaskar. *Deutsche Apotheker Zeitung* **41** : 1578 - 1579.

Sivropoulou A., Nikobu C., Papanikolaou E., Kokkini S., Lanaras T.; Arsenakis M. (1997) Antimicrobial, cytotoxic and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. *J. Agr. Food Chem.* **45** : 3197 - 3201.

Skaltsa H.D., Demetzos C., Lazari D.; Sokovic M. (2003) Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* from Greece. *Phytochemistry* **64** : 743 - 752.

Skocibusic M., Bezic N.; Dunkic V. (2006a) Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis. growing in Croatia. *Food Chem.* **96** : 20 - 28.

Song Y.L.; Lee S.P. (1993a) Characterization and ecological implication of luminous *Vibrio harveyi* isolated from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Bull. Inst. Zool* **32** : 217 - 220.

Song Y.L., Cheng W.; Wang C.H. (1993b) Isolation and characterization of *Vibrio damsela*, infectious for cultured shrimp in Taiwan. *J. Invertebr. Pathol* **61** : 24 - 31.

Sung H.H., Hsu S.F., Chen C.K., Ting Y.Y.; Chao W.L. (2001) Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation. *Aquaculture* **192** : 101 - 110.

Sung H.H., Lin S.C., Chen W.L., Ting Y.Y.; Chao W.L. (2003) Influence of Timsen(TM) on *Vibrio* populations of culture pond water and hepatopancreas and on the hemocytic activity of tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture* **219** : 123-133.

Svoboda K.P. (2000) *Secretory structures of aromatic and medicinal plant*. Microscopix publications, Powys, UK. 4 p.

Svoboda K.P. (2003) Investigation of volatile oil gland of *Satureja hortensis* L. (Summer savory) and phytochemical comparaison of different varieties. *Int. Jour. Arom.* **13** : 196 - 202.

Tao N., Liu Y.; Zhang M. (2009) Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil from the peel of bingtang sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *Int. J. Food Sci. Technol.* **44** : 1281 - 1285.

Tawfeq A.A. (2002) Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Salvia verbenaca*. *J. Biotechnol.* **1** : 45 - 48.

Teisserie E.P.J. (1991) *Chimie des substances odorantes*. Lavoisier, Tec et Doc Paris : 480 p.

Tendencia E.A., De-la-Pena; Leobert D. (2002) Level and percentage recovery of resistance to oxytetracycline and oxolinic acid of bacteria from shrimp ponds. *Aquaculture* **213** : 1 - 13.

Théron E., Holeman M.; Potin-Gautier M. (1994). Authentication of *Ravensara aromatica* and *Ravensara anisata*. *Planta Med* **60** : 489 - 491.

Tomassone R., Derwing C.; Piron M. (1993) *Biométrie, Modélisation des phénomènes biologiques*. MASSON. Paris: pp 115 - 121.

Tomboarisendra A.A. (2005) *Etude des potentialités en huile essentielle des plantes aromatiques de la forêt de Tampolo- région Analanjirofo*. Mémoire de fin d'études d'Ingéniorat. ESSAgronomiques. Département Industries Agricoles et Alimentaires: 90 p.

Tucker A.O., Maciarelo M.J., Brown R.; Griffeth M. (2008) A commercial essential oil of mandravasarotra (*Cinnamosma fragrans* Baill., Canellaceae) from Madagascar. *J. Essent. Oil Res.* **20** : 259-260.

Uribe S., Ramirez J.; Pena A. (1985) Effects of beta-pinene on yeast membrane functions. *J. Bacteriol.* **161** : 1195 - 1200.

Van-Nguyen U. (2002) *Viral diseases in shrimp a challenge to the biotechnologists in Vietnam.* . Ho Chi Minh, Vietnam : Institute for tropical biology : 26 p.

Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernandez-Lopez J.; Perez-Alvarez. (2008a) Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *J Food Control* **19** : 1130 - 1138.

Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernandez-Lopez J.; Alvarez J.A.P.-. (2008b) Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. *Int. J. Food Sci. Technol.* **43** : 526 - 531.

Volak J.; Stodola J. (1994) *Plantes médicinales.* Librairie Gründ, Paris : 319 p.

Weston D.P. (1996) *Environmental considerations in the use of antibacterial drugs in aquaculture.* In: Baird D, Beveridge M, Kelly L, Muir J, editors. *Aquaculture and Water Resources Management.* Blackwell Science: pp 140 - 165.

Yeh R.Y., Shiu Y.L., Ju J.Y., Cheng S.C., Huang S.Y., Lin J.C.; Liu C.H. (2009) Evaluation of the antibacterial activity of leaf and twig extracts of stout camphor tree, *Cinnamomum kanehirae*, and the effects on immunity and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* **27** : 26 - 32.

Yepiz-Plascencia G., Vargas-Albores, Francisco, Higuera-Ciapara, Inocencio. (2000) Penaeid shrimp hemolymph lipoproteins. *Aquaculture* **191** : 177-189.

Zani F., Massimi G., Benvenuti S.; Bianchi A. (1991) Studies on the genotoxic proprieties of essential oils with *Bacillus subtilis* rec-assay and *Salmonella*/microsome. *Planta Med* **57** : 237 - 241.

ANNEXES

Annexe 1 : Hydrodistillation

Matériels :

- Hydrodistillateur composé d'un bec bunsen
- Balance analytique
- Flacon de 10 ml
- Une seringue

Mode opératoire

- Prise d'essais : échantillon frais
- Arracher les feuilles de l'échantillon frais, les grosses tiges seront jetées
- Peser l'échantillon frais à 0,01 près (Pi)
- Introduire l'échantillon dans un ballon de 2 litres, Prendre la précaution de ne pas trop tasser les échantillons dans le ballon, de bien les répartir dans toute sa contenance afin d'éviter une mauvaise répartition de la température
- Remplir de l'eau jusqu'au deux tiers du ballon
- Placer le raccord de réduction entre le ballon et l'essencier en mettant un peu de graisse neutre (silicone) pour assurer l'étanchéité et faciliter le démontage de l'appareil
- Ouvrir le robinet du réfrigérant pour faire circuler l'eau
- Allumer le feu en réglant le gaz pour avoir la température adéquate
- A la fin de la distillation, prélever l'essence surnageant l'eau en ouvrant le robinet de l'essencier et récupérer l'essence dans un flacon
- Sécher l'HE mélangée avec de l'eau en utilisant une seringue 10 ml
- Mesurer le volume d'huile essentielle (V)

Annexe 2 : Humidité

- Peser 5 * 2 g de feuilles par échantillon (avec une précision de 0,002 g)
- Sécher à l'étuve à 105 °C ± 3 °C pendant 3 à 4h
- Mettre les échantillons au dessiccateur contenant du silicagel à chaque sortie de l'étuve avant pesage afin de les refroidir
- Peser les échantillons et les remettre dans l'étuve pendant une heure
- Répéter l'opération jusqu'à l'obtention du poids constant des échantillons

Le poids constant est atteint lorsque la différence entre deux poids successifs est inférieure à 1 % du poids de l'échantillon initial

Soit A le poids de l'échantillon initial et B le poids de l'échantillon après séchage

L'humidité de l'échantillon sera :

$$H (\%) = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

Annexe 3 : Rendement par rapport à la matière sèche

Le rendement en huile essentielle est calculé par la formule suivante :

$$\text{Rdt (\%)} = (v / p) \times 100$$

Où Rdt : rendement en huile essentielle (exprimé en volume d'huile essentielle recueillie en ml par 100g de la matière sèche) ;

V : volume récupéré (ml) ;

P : poids sec du matériel végétal utilisé (g).

$$P = P_i - P_h$$

Où P_i est le poids initial des feuilles introduites dans le ballon (g) et P_h est le poids de l'humidité.

Annexe 4 : Couplage Chromatographie en phase gazeuse et Spectrométrie de Masse

Matériels

- chromatographie gazeuse du type Network 6890, équipé d'un injecteur on-column programmé de 40°C à 240°C
- Gerstel Mps (Gerstel GmbH & Co. KG) combiné d'un Aligent MSD 5973 N (mass selective detector; scan range 40 to 400 Dalton) (Agilent Technologies, Santa Clara, California)

Conditions

- DB- Wax (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) sur silice fondue de 30m de long, 0,25mm d'identification et d'un film d'épaisseur de 0,25µm
- Température du four programmée de 40°C à 170°C pour un débit de 3°C par minute, puis 240° à 10°C par minute
- Hélium est le gaz vecteur avec un débit de 1ml par minute
- Volume d'injection est de 1µl (1µl d'huile essentielle dans 1ml d'hexane : 1/1000)

Annexe 5 : Densité relative

Matériels

- Pycnomètre
- Balance analytique au 10⁻⁴ g près
- Etuve
- Papier Joseph

Réactifs

- Eau distillée
- Alcool

Mode opératoire

- Peser le pycnomètre vide parfaitement propre et sec (A)
- Laisser dans le milieu ambiant jusqu'à atteinte d'un équilibre de température

- Remplir avec de l'eau distillée et peser (B)
- Vider le pycnomètre, Rincer avec un peu d'alcool, Sécher l'étude
- Remplir le pycnomètre d'HE
- Bien essuyer le pycnomètre et peser
- Vider le pycnomètre, Rincer-le avec de l'hexane et de l'alcool puis sécher à l'étuve

Calcul de la densité

Soit A : la masse du pycnomètre vide

B : la masse du pycnomètre + eau distillée

C : la masse du pycnomètre + HE

$$D = \frac{C - A}{B - A} \times \Delta + 0,0012 \left[1 - \frac{C - A}{B - A} \times \Delta \right]$$

Δ : Densité de l'eau à la température t

La précision de la masse est de +/- 0,0005

Annexe 6 : Indice de Réfraction

Matériels

- Réfractomètre d'ABBE
- Source de lumière
- Papier Joseph

Réactif

- Alcool

Mode opératoire

- Laver les prismes de réfractomètre à l'alcool puis essuyer avec du papier Joseph
- Verser 1 à 2 gouttes d'essence entre les prismes
- Déplacer la lunette de visée pour que la ligne de séparation de la plage claire et de la plage sombre se situe à la croisée des fils du réticule
- Lire l'indice de réfraction de l'essence à la température t, faire deux lectures et prendre la moyenne,
- Bien nettoyer les prismes avec de l'alcool après utilisation
- Précision de la mesure : +/- 0,0002

Correction

L'indice de réfraction diminue quand la température augmente d'où la nécessité d'une correction lorsque la température est :

- Inférieure à 20°C, retrancher 0,00044 par degré
- Supérieure à 20°C, ajouter 0,00044 par degré

Annexe 7 : Questionnaire sur les caractéristiques organoleptiques

Date :

Nom :

Echantillon : huile essentielle

Epreuve descriptive

Pour cet échantillon, nous vous prions d'évaluer chacun des descripteurs à l'aide de l'échelle d'intensité. Marquez alors par une croix le de cette échelle l'intensité que vous percevez. Regardez attentivement l'échantillon qui se présente devant vous.

Couleur jaune

0	1	2	3	4	5
nul	Juste identifiable	Faible	Modéré	Fort	Très fort

Couleur verte

0	1	2	3	4	5
nul	Juste identifiable	Faible	Modéré	Fort	Très fort

Couleur blanche

0	1	2	3	4	5
nul	Juste identifiable	Faible	Modéré	Fort	Très fort

Odeur aromatique

0	1	2	3	4	5
nul	Juste identifiable	Faible	Modéré	Fort	Très fort

Aspect liquide

0	1	2	3
nul	Faible	Modéré	Mobile

Epreuve hédonique sur l'odeur

1. Très agréable
2. Agréable
3. Peu agréable
4. Ni agréable ni désagréable
5. Peu désagréable
6. Désagréable
7. Très désagréable

Annexe 8 : Galerie API 20NE

Principe

La galerie API 20 NE se compose d'une galerie constituée de 20 microtubes contenant des milieux et des substrats sous forme déshydratée.

Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du tableau d'identification

Technique

Préparation de la galerie :

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

Préparation de l'inoculum :

- Faire une suspension bactérienne, dans une ampoule de NaCl 0,85% Medium ou dans un tube d'eau distillée stérile, de turbidité égale à celle de l'étalon 0,5 Mcfarland.

Inoculation de la galerie :

- Remplir les tubes (et non les cupules) des tests NO₃ à PNPG avec la suspension précédente. Eviter la formation de bulles.
- Transférer 200 µl (4 à 8 gouttes) de la suspension précédente, dans une ampoule AUX Medium. Homogénéiser.
- Remplir les tubes et cupules des tests GLU à PAC.
- Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests GLU, ADH, URE.
- Incuber 24 heures à 30°C.

Lecture

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.

Identification

Avec le tableau d'identification :

Comparer les réactions notées sur la fiche de résultats avec celle du tableau ;

Avec le catalogue analytique :

Les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1, 2 ou 4) est indiquée pour chacun. Additionner à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondants aux tests positifs.

On obtient un nombre 7 chiffres qui sert de code d'identification.

Avec un logiciel d'identification :

Annexe 9 : Toxicité des huiles essentielles

Matériels

- Larves : Nauplius, Zoé, Mysis et Post – larves
- Bêcher de 2 litres
- Concentration décroissante d'huile essentielle : 0, 100, 200, 400, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 mg/l.

Conditions

- Salinité de 32‰
- Température de 29 °C
- Taux d'oxygène dissout de 5 %
- pH de 7,8

Mode opératoire

- Mettre 2 litres d'eau de mer préalablement filtrée et stérilisée par UV dans le bêcher
 - Ensemencer les larves (densité 100 larves par litre)
 - Acclimater les larves pendant 1 heure
 - Administrer les huiles essentielles
 - Compter les larves après 24 heures de traitement
- la DL 50 est calculée à partir de la formule décrite par:

$$DL\ 50 = DL\ 100 - \Sigma (ab) / n$$

Où

a est la différence entre deux doses successives

b est la moyenne du nombre de morts pour deux doses successives

n est le nombre des animaux utilisés pour l'expérience

Annexe 10 : Concentration bactérienne des prélèvements larvaires

Matériels

- Bêcher de 2 litre
- Tamis placé dans une boîte (maille de 100 à 300 microns selon les stades larvaires)
- Pipette Pasteur munie d'une poire d'aspiration
- Broyeur
- Larves
- Solution saline stérile
- Milieu de culture (MA, TCBS et APW)
- Incubateur

Mode opératoire

- Prélever dans un bêcher 1 litre d'eau contenant des larves dans le bac
- Verser l'eau dans la boîte et tamiser les larves
- Prélever 15 échantillons de larves
- Broyer pendant 20 seconds
- Mettre le broyat dans 5 ml de solution saline stérile (2 %) : solution mère (SM)
- Prélever 1 ml de cette solution SM et faire une dilution 1/10, puis homogénéiser
- Faire des dilutions en cascade jusqu'à 10^{-5}
- Prélever 0,1 ml de la solution diluée au 10^{-1} à 10^{-5}
- Ensemencer directement dans le milieu Marine Agar (MA)
- Incuber pendant 48 h à 37° C pour les bactéries hétérotrophes aérobies
- Après incubation, procéder au dénombrement en choisissant la boîte qui contient 30 à 300 colonies.
- Pour les *Vibrio spp.*, faire un pré enrichissement dans de l'eau alcaline peptonée (1 % de peptone et 1 % de NaCl) de la solution mère.
- Prélever 1 ml de la solution mère (SM) et additionner 1 ml de l'eau alcaline peptonée, puis homogénéiser (SM1)
- Incuber pendant 12 h à 37° C
- Prélever 1 ml de cette solution SM1 et faire une dilution 1/10, puis homogénéiser
- Faire des dilutions en cascade jusqu'à 10^{-5}
- Prélever 0,1 ml de la solution diluée au 10^{-1} à 10^{-5}
- Ensemencer dans le milieu Thiosulfate Citrate Bile Saccharose agar (TCBS)
- Incuber pendant 24 h à 37° C
- Après incubation, procéder au dénombrement en choisissant la boîte qui contient 30 à 300 colonies.

Annexe 11 : Comptage des larves (taux de survie)

Principe

Le comptage des larves permet de faire une estimation de la population présente dans chaque bac ainsi de visualiser la mortalité et par la suite le taux de survie. Les comptages sont effectués deux fois par jour, le matin à 10 heures et l'après midi à 16 heures.

Matériels

- Bêcher de 1 litre

Mode opératoire

- Augmenter l'aération au maximum
- Prélever trois échantillons de un litre par bac niveau du bullage (un à chaque extrémité du bac et un au centre)
- Verser doucement l'eau dans le bêcher et Faire le comptage à l'œil nu
- Aussitôt les trois comptages effectués, faire la moyenne de larves présentes (vivantes) dans les échantillons.
- La moyenne des trois comptages multipliée par le volume du bac égal le nombre de larves présentes dans le bac.
- A partir de ce nombre de larves présente dans le bac qu'on calcul le taux de survie.
- Taux de survie des larves (%) = (nombre total de larves présentes dans chaque bac / nombre total de larves initial) x 100

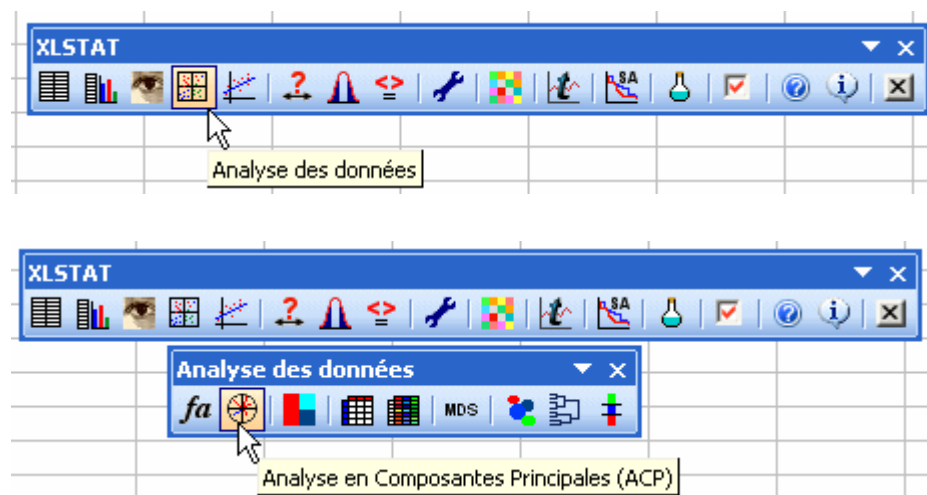
Annexe 12 : Analyse en Composantes Principales (ACP) avec XLSTAT (manuel XLSTAT 2011)

L'ACP est une méthode très efficace pour l'analyse de données quantitatives (continues ou discrètes) se présentant sous la forme de tableaux à M observations / N variables. Elle permet de :

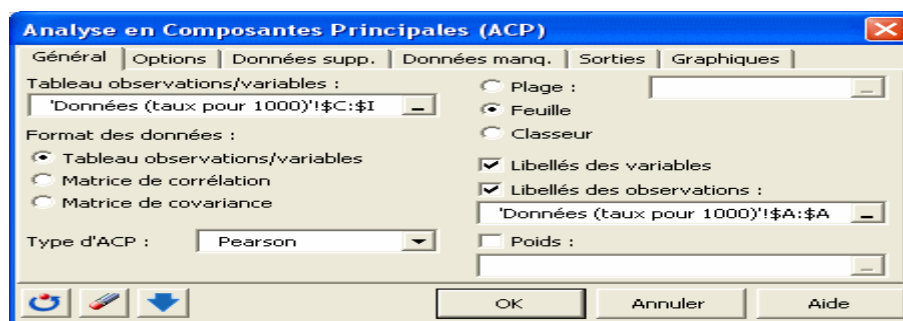
- visualiser et analyser rapidement les corrélations entre les N variables,
- visualiser et analyser les M observations initialement décrites par N variables sur un graphique à deux ou trois dimensions, construit de manière à ce que la dispersion entre les données soit aussi bien préservée que possible,
- construire un ensemble de P facteurs non corrélés ($P \leq N$) qui peuvent ensuite être réutilisés par d'autres méthodes (la régression par exemple).

Les limites de l'ACP viennent du fait que c'est une méthode de projection, et que la perte d'information induite par la projection peut entraîner des interprétations erronées. Des astuces permettent cependant d'éviter ces inconvénients.

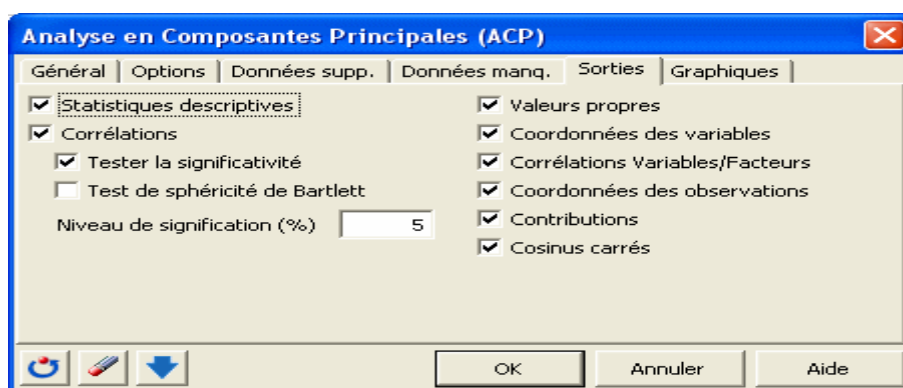
Une fois qu'XLSTAT-Pro est activé, cliquez sur le menu XLSTAT/Analyse de données/Analyse en Composantes Principales, ou cliquez sur le bouton correspondant de la barre "Analyse de données" (voir ci - dessous).



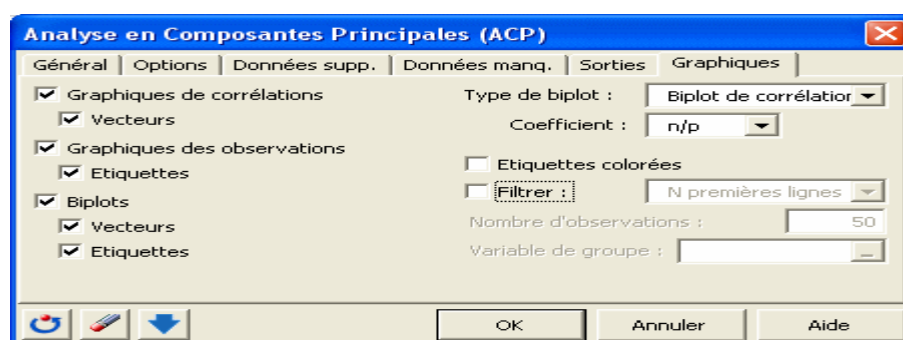
Une fois le bouton cliqué, la boîte de dialogue correspondant à l'Analyse en composantes principales apparaît. Vous pouvez alors sélectionner les données sur la feuille Excel. L'option "Libellés des variables" est activée, car la première ligne de données contient le nom des variables. Le "Format des données" choisi ici est "Observations/Variables" car c'est bien le format des données de départ. Le "Type d'ACP" choisi est Pearson, ce qui signifie que les calculs seront basés sur une matrice composée des coefficients de corrélation de Pearson, le coefficient de Pearson étant le coefficient de corrélation classiquement utilisé.



Dans l'onglet "Sorties", on a choisi d'activer l'option "Tester la significativité" pour afficher en gras les corrélations significativement différentes de 0.

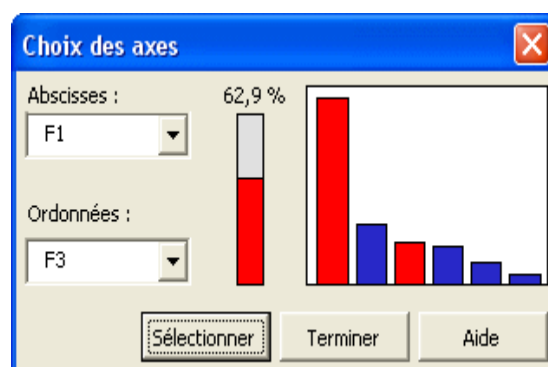
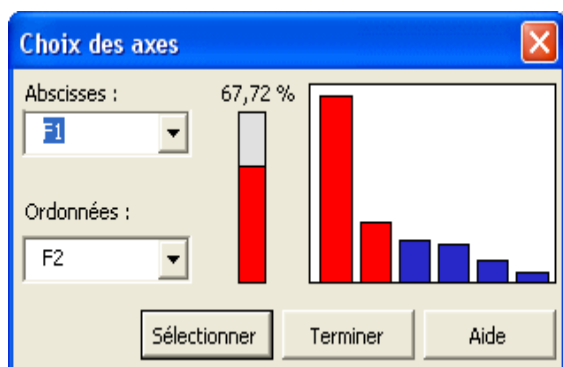


Dans l'onglet "Graphiques", les options d' "Etiquettes" sont toutes activées afin que les libellés des variables et des observations soient bien affichés. L'option de filtrage des observations à afficher est aussi désactivée afin d'afficher toutes les observations. Lorsqu'il y a beaucoup d'observations, il est conseillé de ne pas afficher les étiquettes pour accélérer la génération du graphique, et de ne pas afficher toutes les observations afin de rendre le graphique plus lisible.



Les calculs commencent lorsque vous cliquez sur le bouton "OK". Si vous avez choisi dans le panneau des options XLSTAT l'option "Demander la confirmation des sélections", XLSTAT vous demande de confirmer le nombre de lignes et de colonnes des sélections.

Puis une nouvelle boîte vous permet de choisir les axes pour lesquels les graphiques doivent être affichés. Dans notre cas, le % de variabilité représenté sur les deux premiers axes n'est pas particulièrement élevé (67.72 %) ; pour éviter une mauvaise interprétation des graphiques, un affichage sur les axes 1 et 3 est donc aussi demandé.



Le premier résultat intéressant à analyser est la matrice des corrélations. On remarque le résultat évident que les taux de la proportion de gens étant âgés de plus et moins de 65 ans sont parfaitement corrélés ($r = -1$). Les deux variables sont donc redondantes. On remarque l'immigration provenant d'autres états des USA est très peu corrélée avec les autres variables, y compris avec l'immigration provenant de pays étrangers. Cela indique que les raisons d'immigration sont sûrement différentes pour les deux populations concernées.

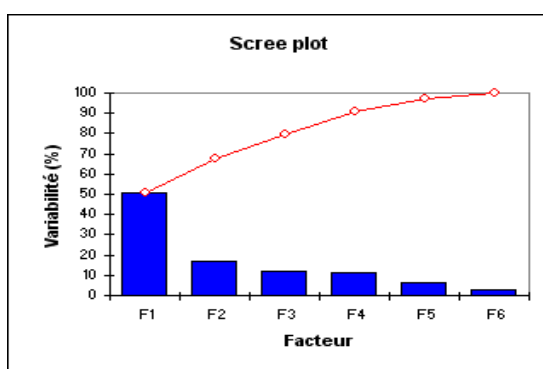
Matrice de corrélation (Pearson) :							
	Variables on domest	migrants avn internat	ix de naiss	ix de mort	op < 65 an	op > 65 an	
Immigratio	1	0,020	0,206	-0,060	-0,232	0,095	-0,095
Américains	0,020	1	-0,133	-0,308	0,422	-0,377	0,377
Immigratio	0,206	-0,133	1	0,295	-0,412	0,204	-0,204
Taux de na	-0,060	-0,308	0,295	1	-0,506	0,640	-0,640
Taux de m	-0,232	0,422	-0,412	-0,506	1	-0,779	0,779
Pop < 65 a	0,095	-0,377	0,204	0,640	-0,779	1	-1,000
Pop > 65 a	-0,095	0,377	-0,204	-0,640	0,779	-1,000	1

Les valeurs en gras sont significativement différentes de 0 à un niveau de signification $\alpha=0,05$

Le tableau suivant et le graphique associé sont liées à un objet mathématique, les valeurs propres, qui sont heureusement liées à un concept très simple : la qualité de la projection lorsque l'on passe de N dimensions (N étant le nombre de variables, ici 7) à un nombre plus faible de dimensions. Dans notre cas, on voit que la première valeur propre vaut 3.567 et représente 51 % de la variabilité. Cela signifie que si l'on représente les données sur un seul axe, alors on aura toujours 51 % de la variabilité totale qui sera préservée.

A chaque valeur propre correspond un facteur. Chaque facteur est en fait une combinaison linéaire des variables de départ. Les facteurs ont la particularité de ne pas être corrélés entre eux. Les valeurs propres et les facteurs sont triés par ordre décroissant de variabilité représentée.

Valeurs propres :						
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Valeur prop	3.567	1.173	0.835	0.776	0.444	0.204
% variance	50.964	16.756	11.932	11.091	6.342	2.914
% cumulé	50.964	67.720	79.652	90.744	97.086	100.000

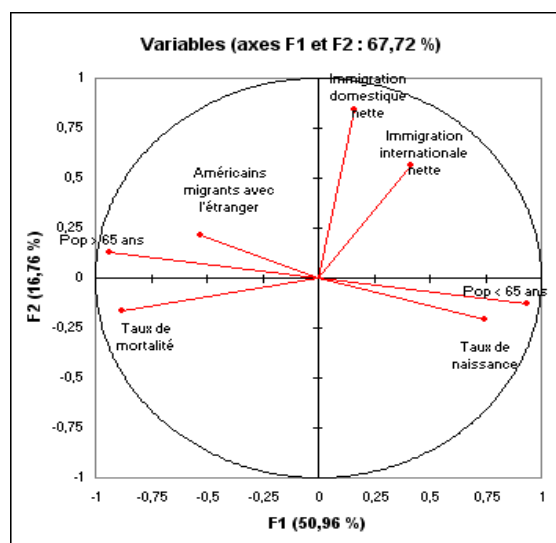


Idéalement, les deux premières valeurs propres correspondent à un % élevé de la variabilité, si bien que la représentation sur les deux premiers axes factoriels est de bonne qualité. Dans notre exemple, cela n'est pas tout à fait le cas, d'où la nécessité de valider les hypothèses formulées par l'utilisation des graphiques sur les facteurs F1 et F2 d'une part, et F1 et F3 d'autre part. Nous voyons ici que le nombre de facteurs est 6, alors que nous avions au départ 7 variables. Cela est dû aux deux variables redondantes. On comprend bien que l'information puisse être synthétisée sur 6 dimensions. Le nombre de dimensions "utiles" maximum est automatiquement détecté par la méthode utilisée.

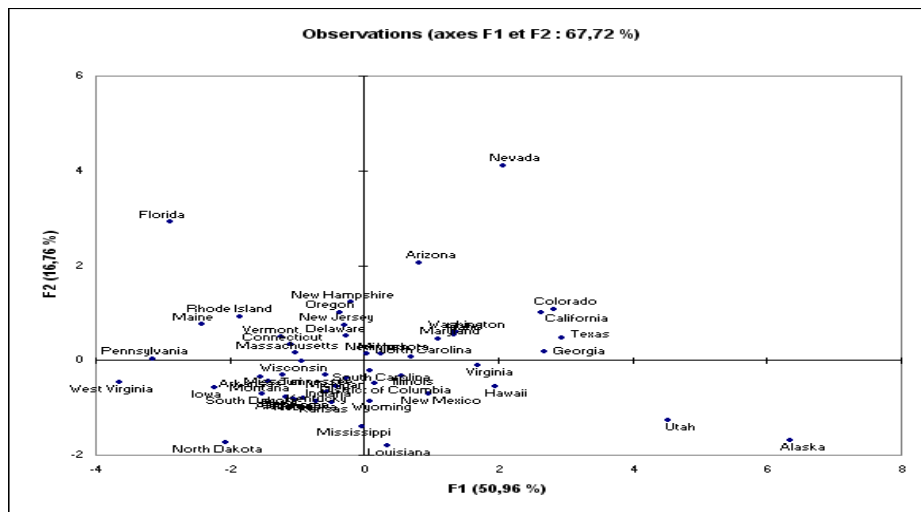
Le premier graphique particulier à la méthode est le cercle des corrélations (voir ci-dessous le cercle sur les axes F1 et F2). Il correspond à une projection des variables initiales sur un plan à deux dimensions constitué par les deux premiers facteurs. Lorsque deux variables sont loin du centre du graphique, alors si elles sont :

- proches les unes par rapport aux autres, alors elles sont significativement positivement corrélées (r proche de 1),
- orthogonales les unes par rapport aux autres, alors elles sont significativement non - corrélées (r proche de 0),
- symétriquement opposées par rapport au centre, alors elles sont significativement négativement corrélées (r proche de -1).

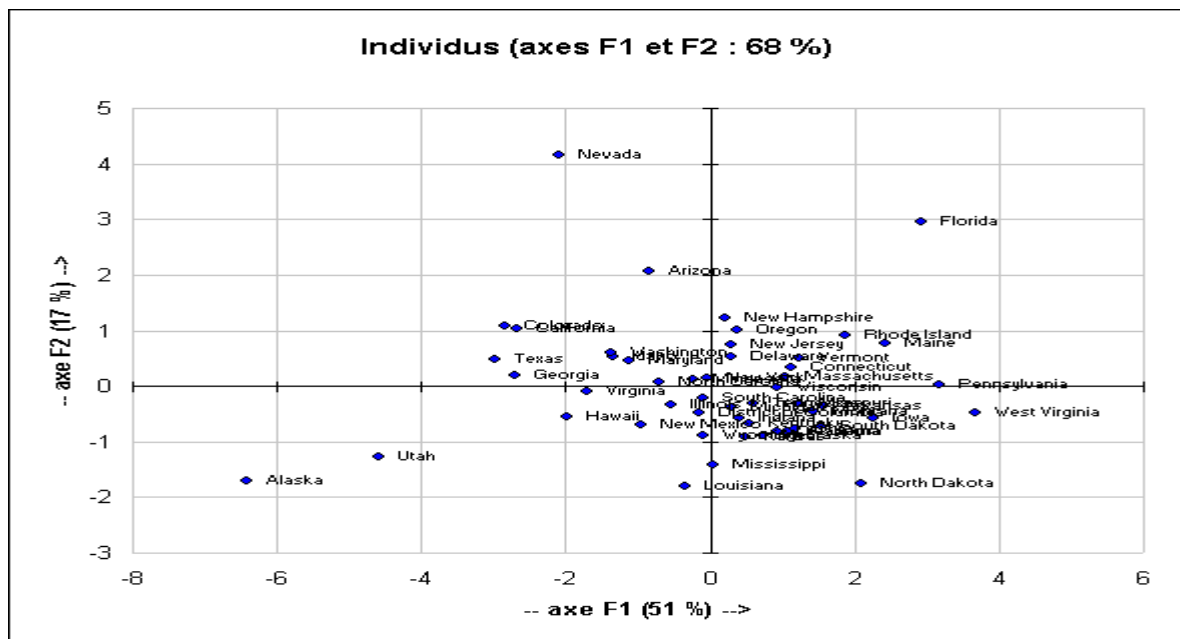
Lorsque les variables sont relativement proches du centre du graphique, alors toute interprétation est hasardeuse, et il est nécessaire de se référer à la matrice de corrélations à d'autres plans factoriels pour interpréter les résultats. Dans notre exemple, nous pourrions déduire du graphique ci-dessous que les variables Immigration domestique, et Immigration Internationale sont corrélées, alors qu'elles ne le sont pas, ce que l'on peut voir sur la matrice des corrélations ou sur le cercle des corrélations sur les axes F1 et F3. En revanche, on voit bien la forte corrélation entre le taux de mortalité et le taux de personnes dont l'âge est supérieur à 65 ans.



Le cercle des corrélations est aussi utile pour interpréter la signification des axes. Dans notre cas, l'axe F1 est clairement lié à l'âge de la population et à son renouvellement, alors que l'axe F2 est essentiellement lié à l'immigration domestique. Ces tendances sont particulièrement intéressantes à dégager pour l'interprétation du graphique des individus (voir ci - dessous). Pour confirmer le fait qu'une variable est fortement liée à un facteur, il suffit de consulter la table des cosinus : plus le cosinus est élevé (en valeur absolue), plus la variable est liée à l'axe. Plus le cosinus est proche de zéro, moins la variable est liée à l'axe. Dans notre cas, nous voyons que ce qui concerne l'immigration internationale sera mieux interprété sur les F2/F3.



Le graphique ci - dessous correspond à l'un des objectifs de l'ACP. Il permet de représenter les individus sur une carte à deux dimensions, et ainsi d'identifier des tendances. On voit dans notre exemple que sur la base des variables démographiques dont on dispose, le Nevada et la Floride sont assez particuliers, de même que l'Utah et Alaska qui semblent partager des caractéristiques : en regardant les données, on s'aperçoit que ces deux états ont une population nettement plus jeune que la moyenne, et une natalité très élevée.

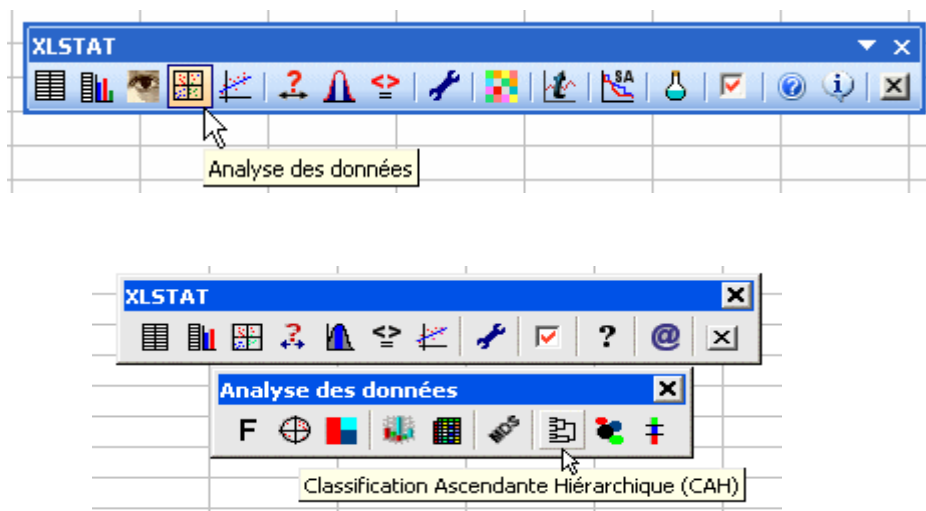


L'Analyse en Composantes Principales est souvent utilisée avant une régression car elle permet d'éviter d'utiliser des variables redondantes, ou avant une classification car elle permet d'identifier la structure de la population et éventuellement de déterminer le nombre de groupes à construire. Les données utilisées dans ce tutoriel sont aussi utilisées dans le tutoriel sur la Classification Ascendante Hiérarchique. En tenant compte des remarques faites ci - dessus, la variable "pop >65" a été supprimée afin de ne pas rendre le poids des variables liées à l'âge trop important pour le regroupement des états.

Annexe 13 : Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) avec XLSTAT (manuel XLSTAT 2011)

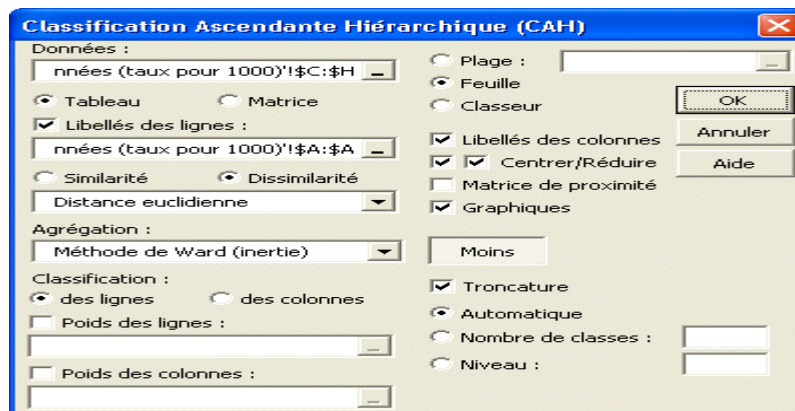
Les données correspondent à la mesure de paramètres démographiques dans 51 Etats des Etats - Unis en 2000 et 2001. Dans le cadre de ce tutoriel, seules les données de l'année 2001 ont été conservées, et afin de supprimer les effets d'échelle, les variables initiales ont été converties en taux pour 1000 habitants. Le but est ici de créer des groupes homogènes d'Etats. Ces données sont aussi utilisées pour le tutoriel de l'Analyse en Composantes Principales (ACP).

Une fois qu'XLSTAT-Pro est activé, cliquez sur le menu XLSTAT/Analyse de données/Classification Ascendante Hiérarchique (CAH), ou cliquez sur le bouton correspondant de la barre "Analyse de données" (voir ci-dessous).

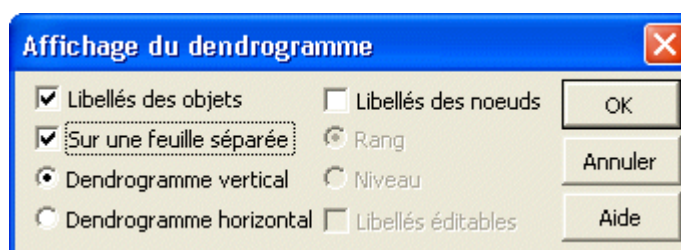


Une fois le bouton cliqué, la boîte de dialogue correspondant à la CAH apparaît. Vous pouvez alors sélectionner les données sur la feuille Excel. Il y a plusieurs façons de sélectionner les données dans la boîte de dialogue XLSTAT (voir le tutoriel sur le sujet). Dans l'exemple étudié ici, les données commencent dès la première ligne; il est donc plus rapide de choisir le mode de sélection par colonnes. C'est pourquoi dans la boîte de dialogue ci - dessous les sélections apparaissent sous forme de colonnes.

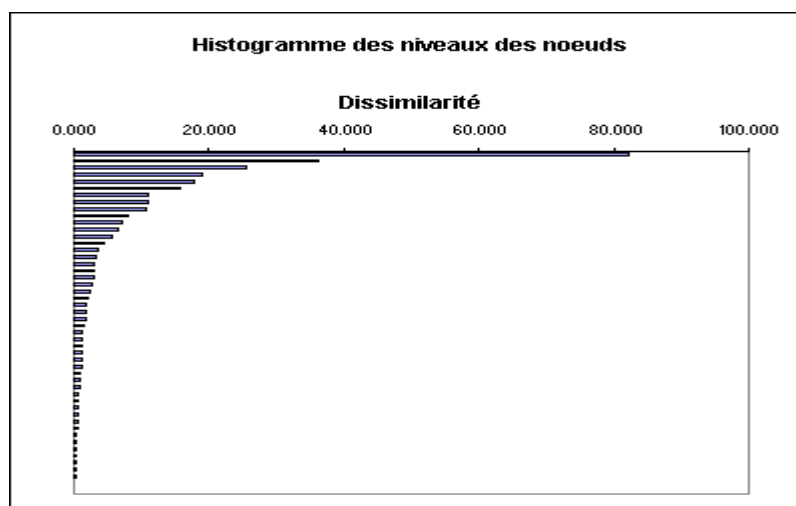
La variable "Population totale" n'a pas été sélectionnée car seuls les aspects dynamiques de la population nous intéressent ici. La dernière colonne n'a pas non plus été sélectionnée, car nous avons vu avec l'analyse en composantes principales que les deux dernières colonnes sont parfaitement corrélées. Les options Centrer / Réduire sont activées de manière à éviter que l'échelle des variables n'influe sur les résultats. Les options avancées (activées en cliquant sur le bouton "Plus" qui devient ensuite "Moins") sont demandées, afin d'obtenir une troncature automatique du dendrogramme (ou arbre de classification). L'option Libellés des colonnes est laissée activée, car la première ligne de données contient le nom des variables, et les libellés des lignes sont sélectionnés.



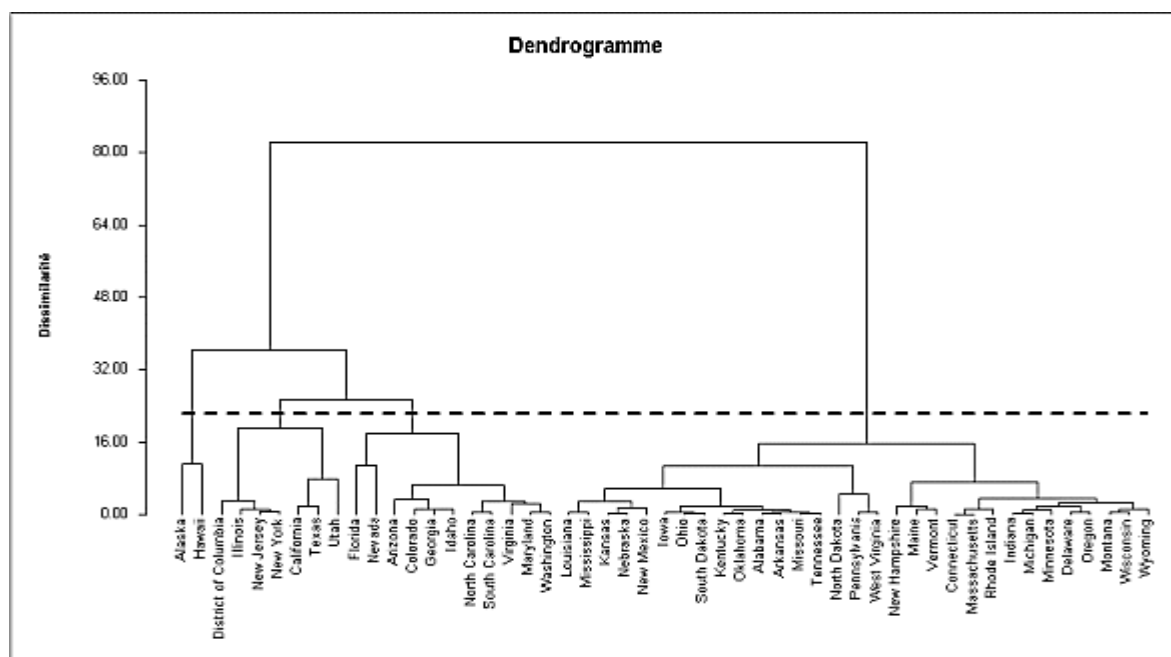
Les calculs commencent lorsque vous cliquez sur le bouton "OK". Si vous avez choisi dans le panneau des options XLSTAT l'option "saisie assistée", XLSTAT vous demande de confirmer le nombre de lignes et de colonnes. Ensuite une boîte de dialogue vous présente les options pour l'affichage des dendrogrammes. Nous avons choisi ici d'afficher les dendrogrammes sur des feuilles séparées.



Le premier résultat est l'histogramme de niveau des noeuds. Sa forme donne des informations sur la structure des données. Lorsque des sauts importants sont observés, on a une agrégation de structures homogènes. C'est en partie sur cette base qu'est créée la troncature automatique qui permet de déterminer le nombre de groupes homogènes.



Le graphique ci - dessous est le dendrogramme. Il représente de manière claire la façon dont l'algorithme procède pour regrouper les individus puis les sous-groupes. Au final, l'algorithme a progressivement regroupé toutes les observations. La ligne en pointillé représente la troncature et permet de visualiser que 4 groupes homogènes ont été identifiés. Le premier groupe regroupe les Etats d'Hawaï et d'Alaska. Les deux groupes suivants sont assez proches du premier groupe, mais suffisamment différents pour constituer des groupes homogènes. Le quatrième groupe est le groupe le plus important. On remarque que l'homogénéité est forte au sein de ce groupe.



Un tableau comprenant le nom de chacun des Etats et le groupe auquel ils sont affectés, est affiché. Il pourra être réutilisé pour d'autres analyses ou pour des applications opérationnelles.

Partition en 4 classes obtenue au niveau de troncature 22.284 :					
Classes des lignes :					
Ligne	Classe				
Alabama	4				
Alaska	1				
Arizona	3				
Arkansas	4				
California	2				
Colorado	3				
Connecticut	4				
Delaware	4				
District of Columbia	2				
Florida	3				
Georgia	3				
Hawaii	1				
Idaho	3				
Illinois	2				

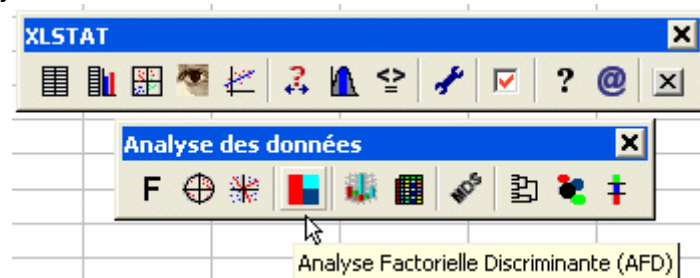
Annexe 14: Analyse Factorielle Discriminante avec XLSTAT (manuel XLSTAT 2011)

Les données correspondent à 150 fleurs d'Iris, décrites par 4 variables quantitatives (longueur des sépales, largeur des sépales, longueur des pétales, largeur des pétales, et par leur espèce. Trois différentes espèces font partie de cette étude: setosa, versicolor and virginica. Notre but est de tester si les quatre variables descriptives permettent d'identifier les espèces, puis de visualiser les données sur un graphique afin de vérifier que les trois espèces sont bien distinguées.



Iris setosa, versicolor et virginica.

Une fois XLSTAT lancé, choisissez la commande XLSTAT/Analyse des données/Analyse Factorielle Discriminante ou cliquez sur le bouton "Analyse Factorielle Discriminante" de la barre d'outils "Analyse des données".

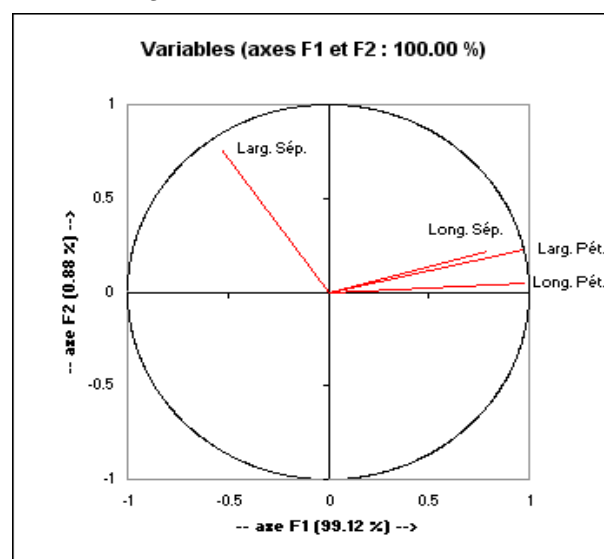


Une fois le bouton cliqué, la boîte de dialogue correspondant à l'Analyse Factorielle Discriminante (AFD) apparaît. Vous pouvez alors sélectionner les données sur la feuille Excel. La "Variable dépendante" correspond à la variable expliquée, qui est dans ce cas précis, l'espèce d'Iris. Les variables explicatives sont les quatre variables dont on dispose. L'option "Libellés des colonnes" est laissée activée car la première ligne des colonnes comprend le nom des variables. Lorsque l'on clique sur le bouton "Plus" de la boîte de dialogue, la partie inférieure de la boîte de dialogue apparaît (le bouton "Plus" est alors remplacé par un bouton "Moins"). La partie inférieure correspond aux options avancées. Nous avons décoché l'option "Egalité des matrices de covariance intra - classes", car comme nous le verrons plus loin (test de Box), faire une telle hypothèse serait faux.



Une fois que vous avez cliqué sur le bouton "OK", les calculs commencent puis les résultats sont affichés. XLSTAT commence par afficher les matrices impliquées dans les calculs. Les deux tests de Box permettent de confirmer que l'on ne peut pas faire l'hypothèse que les matrices de covariance sont identiques pour les 3 espèces.

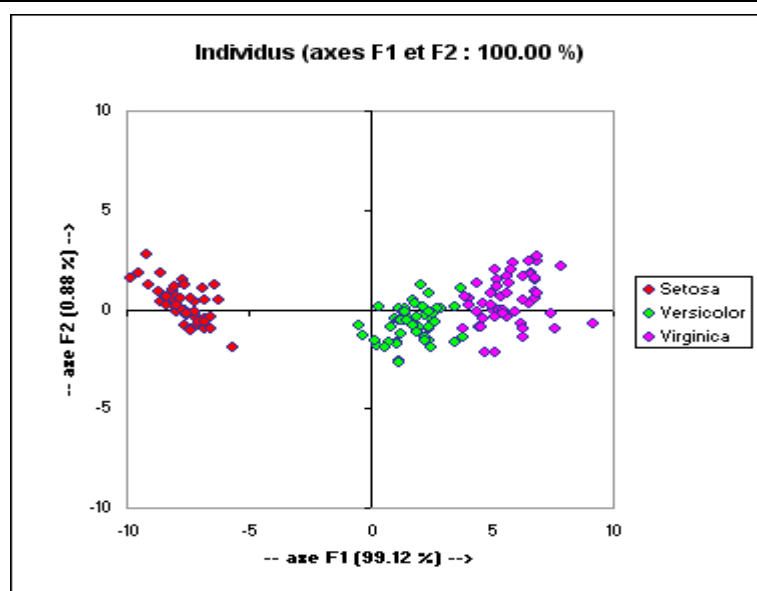
Le graphique suivant montre comment les quatre variables initiales sont corrélées avec les deux facteurs obtenus (ce graphique est construit à partir du tableau des coordonnées des variables). On peut voir que le facteur F1 est corrélé avec Long. Sép., Long. Pét. et Larg. Pét. et que F2 est corrélé avec Larg. Sép.



Le tableau suivant liste pour chaque fleur, ses coordonnées factorielles, la probabilité d'affectation à chacun des groupes, et le carré des distances de Mahalanobis au centroïde de chacun des groupes. Chaque observation est reclassée dans le groupe pour lequel la probabilité est maximale. Les probabilités sont des probabilités a posteriori qui prennent en compte les probabilités a priori au travers de la formule de Bayes. On remarque que les observations (5, 9, 12) ont été reclassées. Il peut y avoir plusieurs raisons pour cela : soit la personne qui a fait mes mesures a fait une erreur d'enregistrement, soit les iris correspondant à ces données ont eu une croissance anormale pour des raisons inconnues, soit le critère de classement utilisé par le spécialiste n'est pas correcte, soit il manque de l'information pour discriminer parfaitement les espèces entre elles.

Classement a priori, a posteriori, probabilités d'appartenance, coordonnées des individus et carrés des distances aux barycentres des groupes :										
Individu	a priori	a posteriori	Prob. Setosa	Prob. Versicolor	Prob. Virginica	F1	F2	arycentre(Setosa)	arycentre(Versicolor)	arycentre(Virginica)
Obs1	Setosa	Setosa	1.000	0.000	0.000	-1.528	6.528	5.848	108.391	179.145
Obs2	Virginica	Virginica	0.000	0.000	1.000	2.444	7.244	770.307	42.266	11.244
Obs3	Versicolor	Versicolor	0.000	0.997	0.003	1.277	6.191	423.336	10.002	21.859
Obs4	Virginica	Virginica	0.000	0.000	1.000	2.404	8.469	813.456	53.028	11.666
Obs5	Virginica	Versicolor	0.000	0.605	0.395	1.625	5.720	520.064	12.926	13.778
Obs6	Setosa	Setosa	1.000	0.000	0.000	-1.402	7.019	8.778	103.550	163.512
Obs7	Virginica	Virginica	0.000	0.000	1.000	1.979	8.656	683.968	55.639	17.807
Obs8	Versicolor	Versicolor	0.000	0.813	0.187	1.538	4.978	431.446	20.036	22.976
Obs9	Versicolor	Virginica	0.000	0.336	0.664	1.598	7.708	488.109	16.061	14.698
Obs10	Setosa	Setosa	1.000	0.000	0.000	-1.805	7.541	16.398	138.753	205.927
Obs11	Versicolor	Versicolor	0.000	0.997	0.003	1.207	6.330	391.790	8.841	20.433
Obs12	Versicolor	Virginica	0.000	0.154	0.846	1.812	5.780	534.065	15.635	12.233
Obs13	Virginica	Virginica	0.000	0.001	0.999	1.941	7.485	623.539	24.287	10.605
Obs14	Versicolor	Versicolor	0.000	1.000	0.000	0.877	5.036	252.687	8.955	29.434

Sur le graphique suivant sont affichés les individus sur les axes factoriels. Ce graphique permet de confirmer que les individus sont bien discriminés sur les axes factoriels obtenus à partir des variables explicatives initiales.



Enfin, la matrice de confusion résume l'information concernant les reclassements d'observations, et on peut en déduire le taux d'erreur apparent, qui correspond au ratio du nombre d'observations reclassées, sur le nombre total d'observations.

Matrice de confusion (échantillon d'apprentissage) :				
	vers Setosa	vers Versicolers	vers Virginic	Somme
de Setosa	50	0	0	50
	33.33%	0.00%	0.00%	33.33%
de Versicolers	0	48	2	50
	0.00%	32.00%	1.33%	33.33%
de Virginic	0	1	49	50
	0.00%	0.67%	32.67%	33.33%
Somme	50	49	51	150
	33.33%	32.67%	34.00%	100.00%

Taux d'erreur apparent (taux de resubstitution sur les données d'apprentissage) : 2.00 %

Annexe 15 : ANOVA suivie de tests de comparaisons multiples avec XLSTAT

Les données correspondent à une expérience où 4 dentifrices ont été chacun testés sur 6 personnes afin que soit mesuré leur impact sur la blancheur des dents. Tous les patients utilisaient auparavant le même dentifrice.

En utilisant l'outil d'ANOVA d'XLSTAT nous cherchons ici à déterminer s'il existe une différence significative entre les différents dentifrices, et si tel est le cas, quel est le dentifrice le plus efficace. Nous sommes dans un cas d'ANOVA à un facteur (le type de dentifrice) équilibrée puisque le nombre de répétitions est le même pour les différents groupes.

Une fois XLSTAT lancé, choisissez la commande XLSTAT/Modélisation/ANOVA ou cliquez sur le bouton "ANOVA" de la barre d'outils "Modélisation".



Une fois le bouton cliqué, la boîte de dialogue correspondant à l'ANOVA apparaît. Vous pouvez alors sélectionner les données sur la feuille Excel. La "Variable dépendante"

correspond à la variable expliquée, soit dans ce cas précis, à la blancheur des dents dont nous voulons expliquer la variabilité par la variable explicative qualitative "Dentifrice". L'option "Libellés des colonnes" est laissée activée car la première ligne des colonnes comprend le nom des variables. Nous laissons l'option "Résidus" sélectionnée car nous analyserons les résidus pour valider les hypothèses de normalité de l'ANOVA, et pour identifier des valeurs extrêmes. L'option comparaison est activée afin que soit affichée la boîte de dialogue dédiée aux tests de comparaisons multiples.

Nous laissons la contrainte à " $a_1=0$ ", ce qui implique que le modèle s'écrira de façon à considérer que le dentifrice T1 aura l'effet de base. Appliquer une contrainte en ANOVA est indispensable pour des raisons théoriques, mais cela ne change ni les résultats (prévisions, R^2 , etc.), ni la qualité de l'analyse.

Une fois que vous avez cliqué sur le bouton "OK", les calculs commencent puis s'interrompent pour vous demander de choisir une méthode de comparaison multiple. Le test de Tukey's est pré-sélectionné car il est fiable et simple à interpréter. Nous ajoutons la méthode REGWQ qui est très fiable, et le test de Dunnett qui permet de comparer toutes les modalités avec une modalité de contrôle (ici le dentifrice T1). Les tests de comparaison multiples sont un domaine complexe des statistiques.

Une fois que l'utilisateur a cliqué sur OK les calculs reprennent et l'affichage des résultats s'achève.

Le premier tableau de résultats fournit les coefficients d'ajustement. Le R^2 (coefficient de détermination) donne une idée du % de variabilité de la variable à modéliser, expliqué par les variables explicatives. Plus ce coefficient est proche de 1, meilleur est le modèle. Dans notre cas, 56 % de la variabilité est expliquée par le type de dentifrice. Le reste de la

variabilité est explicable par des effets qui ne sont ni recensés, ni mesurés dans cette analyse.

Le tableau d'analyse de la variance est un résultat qui doit être analysé attentivement (voir ci-dessous). C'est à ce niveau que l'on teste si l'on peut considérer que la variable explicative sélectionnée (le type de dentifrice) apporte une quantité d'information significative au modèle (hypothèse nulle H_0) ou non. En d'autres termes, c'est un moyen de tester si la moyenne de la variable à modéliser suffirait à décrire les résultats obtenus ou non.

Evaluation de la valeur de l'information apportée par les variables ($H_0 = Y = \text{Moy}(Y)$) :					
Source	ddl	Somme des carrés	moyenne des carrés	F de Fisher	Pr > F
Modèle	3	302.1667	100.7222	8.3356	0.0009
Résidus	20	241.6667	12.0833		
Total	23	543.8333			

Le test du F de Fisher est utilisé. Etant donnée que la probabilité associée au F est dans ce cas de 0.0009, cela signifie que l'on prend un risque de 0.09 % en concluant que la variable explicative apporte une quantité d'information significative au modèle.

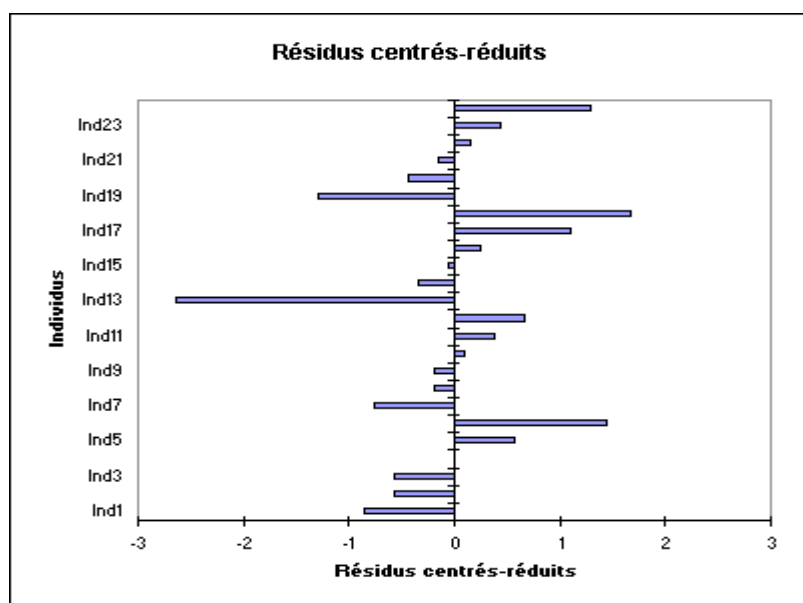
Le tableau suivant fournit les détails sur le modèle et est essentiel dès lors que le modèle doit être utilisé pour faire des prévisions ou des simulations. Dans notre cas particulier, il n'a pas beaucoup d'intérêt. On remarquera simplement que l'intervalle de confiance pour l'effet du dentifrice T2 comprend la valeur 0, ce qui indique que le dentifrice T2 n'est pas significativement différent de T1.

Estimation des paramètres du modèle :						
Paramètre	Valeur	Ecart-type	de Student	Pr > t	lim. inf. à 95%	lim. sup. à 95 %
Constante	19.0000	1.4191	13.3886	0.0000	16.0398	21.9602
Dentifrice -	0.0000	-	-	-	-	-
Dentifrice -	1.6667	2.0069	0.8305	0.4161	-2.5197	5.8531
Dentifrice -	9.1667	2.0069	4.5675	0.0002	4.9803	13.3531
Dentifrice -	5.5000	2.0069	2.7405	0.0126	1.3136	9.6864

Le tableau suivant présente l'analyse des résidus. Une attention particulière doit être portée aux résidus centrés réduits, qui, étant données les hypothèses liées à l'ANOVA, doivent être distribués suivant une loi normale $N(0,1)$. Cela signifie, entre autres, que 95 % des résidus doivent se trouver dans l'intervalle $[-1.96, 1.96]$. Etant donné le faible nombre de données dont on dispose ici, toute valeur en dehors de cet intervalle est révélatrice d'une donnée suspecte. Nous pouvons ici identifier une valeur suspecte (13^{ème} observation) le résidu étant égal à -2.8279. Afin d'expliquer cette valeur, on pourra vérifier que le bon dentifrice a bien été donné à la personne en question, ou analyser la raison pour laquelle la réaction du patient au dentifrice a été plus faible que pour les autres.

Prédictions, résidus, et intervalles de confiance :					
Individus	Poids	Blancheur	Blancheur (Mod)	Résidus	Résidus centrés-réduits
Ind1	1	16.000	19.000	-3.000	-0.863
Ind2	1	17.000	19.000	-2.000	-0.575
Ind3	1	17.000	19.000	-2.000	-0.575
Ind4	1	19.000	19.000	0.000	0.000
Ind5	1	21.000	19.000	2.000	0.575
Ind6	1	24.000	19.000	5.000	1.438
Ind7	1	18.000	20.667	-2.667	-0.767
Ind8	1	20.000	20.667	-0.667	-0.192
Ind9	1	20.000	20.667	-0.667	-0.192
Ind10	1	21.000	20.667	0.333	0.096
Ind11	1	22.000	20.667	1.333	0.384
Ind12	1	23.000	20.667	2.333	0.671
Ind13	1	19.000	28.167	-9.167	-2.637
Ind14	1	27.000	28.167	-1.167	-0.336
Ind15	1	28.000	28.167	-0.167	-0.048

L'histogramme des résidus centrés réduits permet de repérer rapidement la présence de valeurs hors de l'intervalle $[-1.96, 1.96]$.



Enfin, nous allons pouvoir répondre à notre question initiale : y a-t-il une différence significative entre les dentifrices, et si oui, comment peut-on les classer. Comme il est montré dans le tableau ci-dessous, le test de Tukey HSD (Honestly Significantly Different), a été appliqué à l'ensemble des couples de différences possible. Le risque de 5 % que nous avons choisi est utilisé pour déterminer la valeur critique q , qui est comparée à la différence entre les moyennes normées. D'autres logiciels se basent sur la valeur d aussi fournie par XLSTAT. Seulement deux paires semblent être significativement différentes (T1, T3) et (T2, T3). En utilisant le résultat des tests, les dentifrices sont ensuite classés. On notera qu'il n'y a pas transitivité ($T4 < T3$ signifie pas significativement différent, et $T4 < T2$ signifie significativement différent) : $T4 < T3$ mais $T2 < T3$

Test de Tukey (HSD) / Analyse des différences entre les groupes avec un inter

Groupes	Différence	érence réduite	aleur critique	Pr. > Diff	Significatif
T1 ~ T3	-9.167	-4.568	2.799	0.001	Oui
T1 ~ T4	-5.500	-2.741	2.799	0.056	Non
T1 ~ T2	-1.667	-0.830	2.799	0.839	Non
T2 ~ T3	-7.500	-3.737	2.799	0.007	Oui
T2 ~ T4	-3.833	-1.910	2.799	0.256	Non
T4 ~ T3	-3.667	-1.827	2.799	0.290	Non

Valeur d critique de Tukey : 3.958

Classement et regroupements des groupes non significativement différents :

Groupes	Moyenne	Regroupements
T1	19.000	A
T2	20.667	A
T4	24.500	A B
T3	28.167	B

La procédure REGWQ donne un résultat différent (voir ci - dessous), ce qui montre que l'on être prudent lorsque l'on utilise des procédures de comparaison multiples. Trois couples de modalités sont ici significativement différentes : T1 et T4 sont ici jugés significativement différents. Le tableau des regroupements fait maintenant ressortir trois groupes de modalités. Le test de Dunnett a été calculé pour comparer chaque modalité avec la modalité T1. Le test de Dunnett fait aussi ressortir une différence significative entre T1 et T4.

Test REGWQ / Analyse des différences entre les groupes avec un intervalle d					
Groupes	Moyenne	érence rédi	leur critiqu	Pr. > Diff	Significatif
T1 ~ T3	-9.167	-4.568	2.799	0.020	Oui
T1 ~ T4	-5.500	-2.741	2.530	0.154	Oui
T1 ~ T2	-1.667	-0.830	2.417	0.564	Non
T2 ~ T3	-7.500	-3.737	2.530	0.040	Oui
T2 ~ T4	-3.833	-1.910	2.417	0.192	Non
T4 ~ T3	-3.667	-1.827			Non
Classement et regroupements des groupes non significativement différents :					
Groupes	Moyenne	Regroupements			
T1	19.000	A			
T2	20.667	A	B		
T4	24.500		B	C	
T3	28.167			C	

Test de Dunnett / Comparaison des groupes avec le groupe de contrôle T1					
Groupes	Différence	érence rédi	leur critiqu	érence criti	Significatif
T2 ~ T1	1.667	0.830	2.540	5.099	Non
T4 ~ T1	5.500	2.741	2.540	5.099	Oui
T3 ~ T1	9.167	4.568	2.540	5.099	Oui

En conclusion, les différentes pâtes dentifrices testées ont un impact significativement différent sur la blancheur des dents. Comme le dentifrice T1 est déjà sur le marché, afin de promouvoir le nouveau produit, les dentifrices T3 ou T4 pourront être sélectionnés pour être mis sur le marché.

Annexe 16 : Test de Kruskal Wallis avec XLSTAT

Les données correspondent à une étude sensorielle au cours de laquelle on a demandé à 10 experts de noter au cours de deux tests en aveugle la dureté de fromages sur une échelle de 0 à 5. Notre but est de déterminer si la différence de dureté entre les fromages est significative ou non.

Une fois que XLSTAT-Pro est activé, cliquez sur le menu XLSTAT/Tests non paramétriques/Comparaison de k échantillons appariés, ou cliquez sur le bouton correspondant de la barre "Tests non paramétriques".

Une fois le bouton cliqué, la boîte de dialogue apparaît. Vous pouvez alors sélectionner les données sur la feuille Excel. Dans le champ "Données" sélectionnez avec les souris les k colonnes de données correspondant aux k fromages. Comme le nom des fromages est contenu dans la première ligne de données, laissez activée l'option "libellés des colonnes". Activez ensuite l'option "Comparaisons multiples" et l'option "Bonferroni" afin que l'on puisse déterminer quels fromages sont différents si le test de kruskal Wallis nous amenait à rejeter l'hypothèse de similitude entre les fromages.

Les calculs commencent lorsque vous cliquez sur le bouton "OK" puis les résultats sont affichés.

Dans le premier tableau est affichée la statistique Q de Kruskal Wallis et la p-value correspondante. La p-value nous indique que la probabilité de rejeter l'hypothèse nulle alors

qu'elle serait vraie est inférieure à 0.0001. Dans ce cas, on peut en toute confiance rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence significative entre les fromages.

Test de Friedman :									
Remarque : le Q de Friedman a été calculé en tenant compte des ex æquo									
Q (valeur c)	22.500								
Q (valeur c)	7.815								
ddl	3								
p-value uni	< 0.0001								
Alpha	0.05								
<i>Le Q de Friedman est distribué comme un χ^2</i>									
Conclusion :									
Au seuil de signification Alpha=0.050 on peut rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre les 4 échantillons.									
Autrement dit, la différence entre les échantillons est significative.									

Les résultats suivants nous permettent de repérer quels fromages sont différents des autres, comme on le ferait avec des comparaisons multiples en ANOVA. Afin de prendre en compte que les comparaisons sont effectuées sur k groupes, la correction de Bonferroni est utilisée. Elle est appliquée au niveau de signification alpha. Du tableau de synthèse ci-dessous, on déduit que les fromages 2 et 4, 2 et 3, et 1 et 3 sont différents. En revenant aux données, le fromage 3 est clairement celui qui est perçu comme étant le plus dur.

Table des groupes :			
	Somme des ra	Groupes	
Fromage2	13.5	A	
Fromage1	20.5	A	
Fromage4	27	A	B
Fromage3	39		B

Annexe 17 : Matrice de données (*C. fragrans*)

	β -Pinène	Sabinène	1,8 Cinéole	C. linalol ox	T. linalol ox	Linalol	Terp-4-ol	Néral	α -Terpinéol	Géranial	Géraniol	Ac géranique
T03	0,03	0,02	0,10	0,11	0,12	98,15	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
T04	0,00	0,00	0,05	0,13	0,14	98,14	0,00	0,00	0,31	0,00	0,00	0,00
T05	0,00	0,00	0,10	0,05	0,05	98,39	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00
T09	0,06	0,00	0,20	6,95	6,57	78,73	0,00	0,02	0,15	0,01	0,00	0,15
T14	0,03	0,00	0,04	6,99	6,49	78,97	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,13
T06	0,73	0,05	0,09	0,19	0,18	10,42	0,06	33,14	0,10	45,51	2,65	0,01
T07	2,28	0,08	0,25	0,83	0,78	15,14	0,36	29,16	0,73	38,13	2,62	0,01
T08	2,74	0,15	0,21	1,07	0,90	15,47	0,54	27,19	0,85	35,89	3,47	0,00
T12	5,61	0,46	3,27	0,04	0,03	1,68	1,13	13,14	1,98	18,79	1,15	11,86
T13	5,81	0,21	0,32	0,34	0,17	0,95	0,55	29,05	0,80	40,64	6,27	0,04
T15	6,07	0,35	0,32	0,16	0,12	4,55	0,54	30,62	0,78	39,96	4,76	0,01
T16	0,34	0,00	0,17	0,51	0,39	4,45	0,11	28,54	0,28	38,66	18,46	0,02
K06	0,05	0,03	0,30	0,06	0,02	0,48	0,02	39,18	0,06	49,98	3,67	0,02
K07	0,39	0,32	3,29	0,43	0,34	3,30	1,21	32,86	1,41	47,03	0,00	0,00
K08	0,00	0,00	0,13	0,13	0,03	0,37	0,04	35,67	0,03	52,14	4,15	0,01
K12	0,06	0,00	0,29	0,26	0,14	0,36	0,03	38,38	0,08	49,22	3,58	0,00
T10	7,07	0,21	0,44	0,12	0,09	6,81	0,94	8,51	1,20	13,82	1,44	40,52
K09	0,09	0,00	0,17	0,20	0,04	13,09	0,12	4,32	0,53	7,12	1,05	55,65
K10	0,14	0,02	0,23	0,32	0,26	17,52	0,16	4,91	0,60	7,98	0,92	43,14
K11	0,34	0,20	4,27	0,15	0,14	9,48	0,59	4,70	1,09	7,82	0,99	55,70
K01	5,04	12,52	56,32	0,00	0,00	0,76	3,62	0,09	4,77	0,00	0,00	0,00
K03	4,94	8,40	52,88	0,00	0,00	1,45	7,33	0,00	11,11	0,00	0,00	0,00
K04	2,61	5,60	66,28	0,16	0,12	2,32	3,91	0,00	7,02	0,11	0,00	0,01
K05	3,37	6,90	60,48	0,12	0,09	1,54	4,65	0,00	8,62	0,15	0,00	0,00
K13	4,17	6,34	52,59	0,00	0,00	1,86	9,16	0,01	11,85	0,09	0,00	0,00
K14	5,69	12,27	52,55	0,00	0,00	0,99	4,94	0,00	11,59	0,00	0,00	0,01
K15	4,74	8,62	53,98	0,00	0,00	0,27	6,70	0,05	12,11	0,11	0,00	0,04

Annexe 18 : Matrice de données (*C. madagascariensis*)

	β -Pinène	1,8 Cinéole	C. linalol ox	T. linalol ox	Linalol	Terp-4-ol	Pinocarvéol	α -Terpinéol	Géranial	Calaménène	Caryophyllène ox	Humulène ox
TPL01	0,86	29,43	1,08	0,75	11,62	6,58	0,14	11,07	0,23	1,53	15,36	1,34
TPL02	0,37	32,26	2,25	1,81	15,26	4,42	0,31	8,91	0,28	2,28	9,38	1,12
TPL03	0,73	36,48	1,13	0,96	5,14	1,90	0,30	4,31	0,21	0,42	22,84	1,51
TPL04	0,76	24,60	0,79	0,61	9,95	6,62	0,29	11,34	0,19	3,13	14,18	1,51
TPL05	0,31	10,94	0,36	0,28	6,32	7,58	0,18	11,58	0,00	2,30	24,73	1,72
TPL06	1,18	46,18	1,48	1,27	10,53	2,49	0,29	5,71	0,36	0,24	10,04	0,87
TPL07	0,54	39,60	1,98	1,62	9,89	2,68	0,47	5,58	0,05	1,19	13,52	1,16
TPL 08	0,43	12,36	0,86	0,58	27,88	3,68	0,12	0,00	5,35	2,14	27,09	1,14
TPL09	0,49	20,04	1,63	1,32	19,11	4,38	0,24	7,29	0,17	6,09	7,14	4,20
TPL10	0,47	45,72	0,74	0,61	5,41	4,76	0,22	7,56	0,45	1,23	11,55	0,88
CAM08	2,67	23,68	0,75	0,65	9,50	2,94	1,43	3,64	0,65	0,00	18,31	3,57
CAM10	15,36	0,62	0,49	0,37	13,04	2,47	4,43	2,73	0,07	1,12	14,10	1,87
CAM01	1,37	10,72	1,61	1,50	29,45	4,10	1,57	4,31	0,02	1,77	19,93	2,98
CAM02	0,74	0,60	3,70	3,71	21,09	0,51	3,09	0,77	0,06	0,75	28,80	7,26
CAM03	0,65	2,13	4,11	4,10	12,55	0,68	5,31	1,62	0,05	0,26	30,45	6,43
CAM04	3,81	0,55	3,50	3,40	20,07	0,66	3,00	0,96	0,02	0,73	26,62	6,37
CAM05	1,16	0,84	2,55	2,19	6,67	0,64	6,20	2,03	0,02	0,62	36,74	4,19
CAM06	0,32	0,90	8,95	8,52	19,77	0,09	1,94	0,59	0,05	0,53	25,03	4,38
CAM07	3,91	0,40	2,69	2,49	29,31	0,68	1,97	1,49	0,00	0,79	20,84	4,42
CAM09	1,00	0,78	1,73	1,53	13,77	0,36	2,70	1,23	0,03	1,50	36,41	9,48

Annexe 19 : Matrice de données (*Cinnamosma* sp.)

	β -Pinène	Sabinène	1,8 Cinéole	C. linalool ox	T. linalool ox	Linalol	Terp-4-ol	Pinocarveol	Néral	α - Terpinéol	Géranial	Calamenène	Géraniol	Caryophyllène ox	Humulène ox	Ac géranique
T03	0,03	0,02	0,10	0,11	0,12	98,15	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T04	0,00	0,00	0,05	0,13	0,14	98,14	0,00	0,00	0,00	0,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T05	0,00	0,00	0,10	0,05	0,05	98,39	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T09	0,06	0,00	0,20	6,95	6,57	78,73	0,00	0,00	0,02	0,15	0,01	0,01	0,00	0,12	0,02	0,15
T14	0,03	0,00	0,04	6,99	6,49	78,97	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,10	0,01	0,13
T06	0,73	0,05	0,09	0,19	0,18	10,42	0,06	0,00	33,14	0,10	45,51	0,00	2,65	0,42	0,08	0,01
T07	2,28	0,08	0,25	0,83	0,78	15,14	0,36	0,14	29,16	0,73	38,13	0,11	2,62	0,66	0,08	0,01
T08	2,74	0,15	0,21	1,07	0,90	15,47	0,54	0,24	27,19	0,85	35,89	0,22	3,47	0,72	0,23	0,00
T12	5,61	0,46	3,27	0,04	0,03	1,68	1,13	0,08	13,14	1,98	18,79	0,20	1,15	0,14	0,05	11,86
T13	5,81	0,21	0,32	0,34	0,17	0,95	0,55	0,56	29,05	0,80	40,64	0,00	6,27	2,37	0,65	0,04
T15	6,07	0,35	0,32	0,16	0,12	4,55	0,54	0,03	30,62	0,78	39,96	0,01	4,76	0,41	0,11	0,01
T16	0,34	0,00	0,17	0,51	0,39	4,45	0,11	0,07	28,54	0,28	38,66	0,16	18,46	1,11	0,00	0,02
K06	0,05	0,03	0,30	0,06	0,02	0,48	0,02	0,00	39,18	0,06	49,98	0,06	3,67	0,00	0,00	0,02
K07	0,39	0,32	3,29	0,43	0,34	3,30	1,21	0,10	32,86	1,41	47,03	0,15	0,00	1,21	0,31	0,00
K08	0,00	0,00	0,13	0,13	0,03	0,37	0,04	0,00	35,67	0,03	52,14	0,15	4,15	0,00	0,00	0,01
K12	0,06	0,00	0,29	0,26	0,14	0,36	0,03	0,00	38,38	0,08	49,22	0,16	3,58	0,67	0,14	0,00
T10	7,07	0,21	0,44	0,12	0,09	6,81	0,94	0,07	8,51	1,20	13,82	0,36	1,44	1,31	0,39	40,52
K09	0,09	0,00	0,17	0,20	0,04	13,09	0,12	0,00	4,32	0,53	7,12	0,46	1,05	1,07	0,30	55,65
K10	0,14	0,02	0,23	0,32	0,26	17,52	0,16	0,18	4,91	0,60	7,98	0,75	0,92	2,39	0,33	43,14
K11	0,34	0,20	4,27	0,15	0,14	9,48	0,59	0,00	4,70	1,09	7,82	0,35	0,99	0,88	0,24	55,70
K01	5,04	12,52	56,32	0,00	0,00	0,76	3,62	0,15	0,09	4,77	0,00	0,00	0,00	0,18	0,00	0,00
K03	4,94	8,40	52,88	0,00	0,00	1,45	7,33	0,00	0,00	11,11	0,00	0,04	0,00	0,16	0,00	0,00
K04	2,61	5,60	66,28	0,16	0,12	2,32	3,91	0,17	0,00	7,02	0,11	0,00	0,00	0,60	0,16	0,01
K05	3,37	6,90	60,48	0,12	0,09	1,54	4,65	0,21	0,00	8,62	0,15	0,09	0,00	0,92	0,27	0,00
K13	4,17	6,34	52,59	0,00	0,00	1,86	9,16	0,03	0,01	11,85	0,09	0,00	0,00	0,23	0,00	0,00
K14	5,69	12,27	52,55	0,00	0,00	0,99	4,94	0,00	0,00	11,59	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01
K15	4,74	8,62	53,98	0,00	0,00	0,27	6,70	0,06	0,05	12,11	0,11	0,30	0,00	0,36	0,10	0,04

Suite annexe 19

	β-Pinène	Sabinène	1,8 Cinéole	C. linalool ox	T. linalool ox	Linalol	Terp-4-ol	Pinocarveol	Néral	α- Terpinéol	Géranial	Calamenène	Géranol	Caryophyllène ox	Humulène ox	Ac géranique
TPL01	0,86	0,34	29,43	1,08	0,75	11,62	6,58	0,14	0,12	11,07	0,23	1,53	0,00	15,36	1,34	0,55
TPL02	0,37	0,15	32,26	2,25	1,81	15,26	4,42	0,31	0,10	8,91	0,28	2,28	0,00	9,38	1,12	0,88
TPL03	0,73	0,15	36,48	1,13	0,96	5,14	1,90	0,30	0,19	4,31	0,21	0,42	0,00	22,84	1,51	0,06
TPL04	0,76	0,24	24,60	0,79	0,61	9,95	6,62	0,29	0,18	11,34	0,19	3,13	0,00	14,18	1,51	0,80
TPL05	0,31	0,07	10,94	0,36	0,28	6,32	7,58	0,18	0,19	11,58	0,00	2,30	0,00	24,73	1,72	1,51
TPL06	1,18	1,35	46,18	1,48	1,27	10,53	2,49	0,29	0,26	5,71	0,36	0,24	0,00	10,04	0,87	0,42
TPL07	0,54	0,21	39,60	1,98	1,62	9,89	2,68	0,47	0,28	5,58	0,05	1,19	0,00	13,52	1,16	0,78
TPL09	0,49	0,09	20,04	1,63	1,32	19,11	4,38	0,24	0,12	7,29	0,17	6,09	0,00	7,14	4,20	1,24
TPL10	0,47	0,41	45,72	0,74	0,61	5,41	4,76	0,22	0,18	7,56	0,45	1,23	0,00	11,55	0,88	0,61
CAM08	2,67	0,92	23,68	0,75	0,65	9,50	2,94	1,43	0,16	3,64	0,65	0,00	2,16	18,31	3,57	1,29
CAM1	1,37	0,08	10,72	1,61	1,50	29,45	4,10	1,57	0,22	4,31	0,02	1,77	0,00	19,93	2,98	0,35
CAM02	0,74	0,01	0,60	3,70	3,71	21,09	0,51	3,09	0,45	0,77	0,06	0,75	0,00	28,80	7,26	0,06
CAM03	0,65	0,11	2,13	4,11	4,10	12,55	0,68	5,31	1,33	1,62	0,05	0,26	0,00	30,45	6,43	2,76
CAM04	3,81	0,14	0,55	3,50	3,40	20,07	0,66	3,00	0,51	0,96	0,02	0,73	0,00	26,62	6,37	0,07
CAM05	1,16	0,02	0,84	2,55	2,19	6,67	0,64	6,20	1,52	2,03	0,02	0,62	0,00	36,74	4,19	0,10
CAM06	0,32	0,03	0,90	8,95	8,52	19,77	0,09	1,94	0,49	0,59	0,05	0,53	0,00	25,03	4,38	0,13
CAM07	3,91	0,08	0,40	2,69	2,49	29,31	0,68	1,97	0,79	1,49	0,00	0,79	0,00	20,84	4,42	1,74
CAM09	1,00	0,00	0,78	1,73	1,53	13,77	0,36	2,70	0,56	1,23	0,03	1,50	0,00	36,41	9,48	0,16
CAM10	15,36	0,72	0,62	0,49	0,37	13,04	2,47	4,43	0,54	2,73	0,07	1,12	0,00	14,10	1,87	0,09
TPL 08	0,43	0,21	12,36	0,86	0,58	27,88	3,68	0,12	0,10	0,00	5,35	2,14	0,00	27,09	1,14	0,27

Annexe 20 : Matrice de données (DL 50 trois huiles essentielles)

Stade	Essai	néral géranial	caryophyllène ox	acide géranique
Nauplii	Essai 1	872	875,50	876,33
Nauplii	Essai 2	872,66	874,50	875,00
Nauplii	Essai 3	871,66	875,83	874,66
Zoé	Essai 1	876,5	882,66	887,50
Zoé	Essai 2	886,66	884,00	888,33
Zoé	Essai 3	888,5	882,83	886,66
Mysis	Essai 1	885,33	885,33	886,83
Mysis	Essai 2	885,16	887,67	887,50
Mysis	Essai 3	882,33	887,17	889,16
Post-larve	Essai 1	900,16	902,16	905,16
Post-larve	Essai 2	901,33	902,66	907,00
Post-larve	Essai 3	906,66	904,16	899,16

Annexe 21 : Matrice de données (DL 50 quatre stades)

Stade	Nauplii	Zoé	Mysis	Post-larve
néral géranial	872	876,5	885,33	900,16
oxyde de caryophyllène	875,5	882,66	885,33	902,16
acide géranique	876,33	887,5	886,83	905,16
néral géranial	872,66	886,66	885,16	901,33
oxyde de caryophyllène	874,5	884	887,67	902,66
acide géranique	875	888,33	887,50	907
néral géranial	871,66	888,5	882,33	906,66
oxyde de caryophyllène	875,83	882,83	887,17	904,16
acide géranique	874,66	886,66	889,16	899,16

Annexe 22 : Matrice de données (Concentration en FMT log CFU/ml)

	Antibiotique	Néral & géranial	Acide géranique	Caryophyllène ox	Témoin
N1	4,17	4,18	4,18	4,18	4,17
N6	4,26	4,26	4,31	4,27	4,26
Z1	4,38	4,39	4,44	4,38	4,48
Z1 Z2	4,45	4,45	4,58	4,44	5,22
Z2	4,49	4,50	4,80	4,50	5,41
Z3	4,92	4,92	5,13	4,92	5,46
Z3 M1	5,03	5,04	5,26	5,05	5,49
M1	5,18	5,19	5,33	5,20	5,68
M2	5,29	5,29	5,43	5,30	5,89
M3	5,34	5,35	5,55	5,35	5,99
M3 PL1	5,43	5,43	5,65	5,43	6,07
PL1	5,48	5,48	5,79	5,47	6,15
PL2	5,62	5,63	5,86	5,62	6,30
PL3	5,78	5,80	5,98	5,80	6,38
PL4	5,89	5,89	6,04	5,90	6,43
PL5	5,96	5,97	6,09	5,98	6,47
PL6	6,00	6,01	6,11	6,02	6,50
PL7	6,02	6,03	6,13	6,03	6,50
PL8	6,07	6,08	6,15	6,08	6,52
N1	4,18	4,19	4,23	4,20	4,22
N6	4,26	4,25	4,27	4,26	4,30
Z1	4,38	4,39	4,42	4,40	4,54
Z1 Z2	4,52	4,54	4,56	4,54	5,18
Z2	4,60	4,61	4,65	4,61	5,38
Z3	4,91	4,92	5,03	4,92	5,44
Z3 M1	5,09	5,10	5,16	5,10	5,67
M1	5,20	5,20	5,25	5,21	5,78
M2	5,30	5,31	5,34	5,31	5,98
M3	5,37	5,37	5,51	5,38	6,07
M3 PL1	5,44	5,45	5,58	5,45	6,14
PL1	5,59	5,59	5,74	5,61	6,22
PL2	5,64	5,65	5,85	5,66	6,28
PL3	5,82	5,82	5,96	5,83	6,38
PL4	5,92	5,93	6,01	6,00	6,44
PL5	6,00	6,00	6,05	6,01	6,48
PL6	6,02	6,02	6,08	6,03	6,48
PL7	6,05	6,06	6,11	6,06	6,50
PL8	6,08	6,08	6,14	6,07	6,53
N1	4,15	4,15	4,20	4,15	4,14
N6	4,33	4,34	4,28	4,35	4,31
Z1	4,37	4,38	4,42	4,41	4,56
Z1 Z2	4,59	4,58	4,57	4,59	5,18
Z2	4,67	4,66	4,79	4,67	5,42
Z3	4,99	5,00	5,08	5,01	5,45
Z3 M1	5,11	5,11	5,23	5,11	5,65
M1	5,23	5,23	5,30	5,24	5,82
M2	5,32	5,33	5,40	5,33	5,98
M3	5,38	5,37	5,53	5,37	6,11
M3 PL1	5,42	5,43	5,62	5,43	6,18
PL1	5,66	5,67	5,74	5,67	6,24
PL2	5,74	5,74	5,85	5,75	6,32
PL3	5,84	5,85	5,96	6,00	6,42
PL4	5,95	5,95	6,00	6,01	6,45
PL5	6,01	6,00	6,03	6,01	6,48
PL6	6,05	6,05	6,05	6,05	6,50
PL7	6,06	6,07	6,11	6,08	6,53
PL8	6,09	6,10	6,11	6,10	6,55

Annexe 23 : Matrice de données (Concentration en *Vibrio* sp. log CFU/ml)

	Antibiotique	Néral & géranial	Ac géranique	Caryophyllène ox	Témoin
N1	4,10	4,11	4,13	4,12	4,12
N6	4,12	4,11	4,17	4,12	4,16
Z1	4,13	4,14	4,19	4,14	4,27
Z1 Z2	4,13	4,15	4,25	4,15	4,42
Z2	4,14	4,16	4,28	4,16	4,46
Z3	4,13	4,17	4,30	4,17	4,51
Z3 M1	4,21	4,21	4,34	4,21	4,72
M1	4,26	4,27	4,38	4,27	4,94
M2	4,27	4,29	4,39	4,29	5,02
M3	4,32	4,32	4,40	4,32	5,14
M3 PL1	4,34	4,36	4,42	4,37	5,21
PL1	4,35	4,36	4,46	4,37	5,40
PL2	4,36	4,37	4,47	4,38	5,43
PL3	4,37	4,39	4,49	4,39	5,44
PL4	4,39	4,40	4,51	4,41	5,49
PL5	4,41	4,43	4,53	4,43	5,50
PL6	4,41	4,43	4,55	4,43	5,55
PL7	4,42	4,42	4,56	4,44	5,58
PL8	4,42	4,43	4,57	4,45	5,60
N1	4,06	4,10	4,13	4,10	4,15
N6	4,14	4,14	4,19	4,15	4,23
Z1	4,15	4,15	4,21	4,15	4,27
Z1 Z2	4,18	4,18	4,27	4,19	4,39
Z2	4,17	4,19	4,29	4,19	4,45
Z3	4,21	4,23	4,32	4,23	4,47
Z3 M1	4,19	4,23	4,33	4,24	4,67
M1	4,25	4,25	4,40	4,26	4,83
M2	4,31	4,31	4,40	4,32	4,99
M3	4,34	4,35	4,40	4,35	5,11
M3 PL1	4,33	4,36	4,42	4,36	5,20
PL1	4,35	4,36	4,44	4,37	5,40
PL2	4,39	4,39	4,47	4,39	5,44
PL3	4,39	4,40	4,48	4,40	5,45
PL4	4,41	4,41	4,49	4,42	5,50
PL5	4,42	4,43	4,53	4,43	5,53
PL6	4,41	4,41	4,53	4,44	5,56
PL7	4,44	4,45	4,54	4,45	5,57
PL8	4,45	4,45	4,59	4,45	5,58
N1	4,14	4,14	4,16	4,15	4,17
N6	4,20	4,21	4,22	4,21	4,27
Z1	4,20	4,21	4,24	4,24	4,26
Z1 Z2	4,18	4,18	4,30	4,25	4,36
Z2	4,20	4,20	4,31	4,25	4,45
Z3	4,18	4,22	4,33	4,26	4,47
Z3 M1	4,32	4,32	4,33	4,33	4,69
M1	4,36	4,36	4,36	4,36	4,88
M2	4,35	4,35	4,37	4,36	5,03
M3	4,41	4,41	4,40	4,41	5,11
M3 PL1	4,43	4,43	4,45	4,45	5,22
PL1	4,43	4,43	4,44	4,45	5,38
PL2	4,47	4,47	4,48	4,48	5,41
PL3	4,47	4,47	4,48	4,48	5,44
PL4	4,48	4,48	4,50	4,48	5,48
PL5	4,49	4,49	4,56	4,48	5,51
PL6	4,51	4,52	4,58	4,49	5,57
PL7	4,50	4,52	4,59	4,52	5,56
PL8	4,51	4,51	4,56	4,53	5,58

Annexe 24 : Matrice de données (Taux de survie arc sin)

	Témoïn	Antibiotique	Néral géranial	Ac géranique	Caryophyllène ox
N1	1,57	1,57	1,57	1,57	1,57
N6	1,57	1,57	1,57	1,57	1,57
Z1	1,57	1,57	1,57	1,57	1,57
Z1 Z2	1,32	1,42	1,46	1,42	1,38
Z2	1,25	1,43	1,28	1,31	1,34
Z3	1,19	1,42	1,28	1,32	1,34
Z3 M1	1,12	1,44	1,28	1,24	1,25
M1	1,01	1,28	1,19	1,15	1,20
M2	1,00	1,28	1,20	1,13	1,16
M3	0,92	1,27	1,18	1,12	1,11
M3 PL1	0,85	1,24	1,17	1,10	1,10
PL1	0,74	1,23	1,16	1,07	1,08
PL2	0,67	1,19	1,12	1,07	1,08
PL3	0,59	1,16	1,08	1,04	1,05
PL4	0,52	1,16	1,07	1,01	1,05
PL5	0,45	1,15	1,07	1,00	1,04
PL6	0,44	1,12	1,01	1,00	1,03
PL7	0,42	1,12	1,01	0,98	1,02
PL8	0,36	1,07	1,02	0,98	1,01
N1	1,57	1,57	1,57	1,57	1,57
N6	1,57	1,57	1,57	1,57	1,57
Z1	1,57	1,57	1,57	1,57	1,57
Z1 Z2	1,32	1,37	1,37	1,32	1,40
Z2	1,27	1,40	1,40	1,33	1,25
Z3	1,22	1,39	1,28	1,30	1,25
Z3 M1	1,17	1,34	1,24	1,31	1,25
M1	1,05	1,33	1,19	1,22	1,16
M2	0,95	1,33	1,18	1,18	1,13
M3	0,89	1,28	1,17	1,10	1,13
M3 PL1	0,83	1,26	1,10	1,10	1,11
PL1	0,74	1,28	1,09	1,07	1,08
PL2	0,70	1,21	1,05	1,06	1,07
PL3	0,59	1,20	1,04	1,02	1,04
PL4	0,53	1,22	1,02	1,02	1,04
PL5	0,52	1,17	1,00	0,99	1,04
PL6	0,42	1,13	1,07	0,99	1,02
PL7	0,39	1,09	1,02	0,98	1,02
PL8	0,35	1,08	1,02	0,98	1,01
N1	1,57	1,57	1,57	1,57	1,57
N6	1,57	1,57	1,57	1,57	1,57
Z1	1,57	1,57	1,57	1,57	1,57
Z1 Z2	1,23	1,49	1,35	1,43	1,33
Z2	1,25	1,34	1,40	1,43	1,32
Z3	1,32	1,32	1,34	1,24	1,27
Z3 M1	1,16	1,31	1,27	1,24	1,25
M1	1,03	1,35	1,24	1,20	1,18
M2	0,95	1,30	1,16	1,16	1,15
M3	0,90	1,32	1,14	1,15	1,12
M3 PL1	0,85	1,28	1,15	1,12	1,12
PL1	0,79	1,23	1,11	1,09	1,09
PL2	0,66	1,23	1,08	1,05	1,06
PL3	0,64	1,19	1,06	1,05	1,04
PL4	0,58	1,14	1,07	1,03	0,99
PL5	0,50	1,12	1,07	0,99	0,97
PL6	0,46	1,11	1,01	0,98	0,97
PL7	0,41	1,08	1,04	0,98	0,96
PL8	0,40	1,12	0,98	0,98	0,96

Titre : Variabilités chimiques et activités antimicrobiennes des huiles essentielles de *Cinnamosma* spp. (Alternative aux antibiotiques en aquaculture de crevette)

Auteur : RAZAFIMAMONJISON Dina Emile Nicolas Gaylor

RESUME

Les huiles essentielles de *Cinnamosma fragrans* et *Cinnamosma madagascariensis* ont été analysées par GC-SM. Les analyses statistiques des données (ACP, CAH et AFD) ont permis de distinguer quatre chémotypes pour les huiles essentielles de *C. fragrans*, dominés respectivement par le linalol (90,47 %) ; le 1,8 cinéole (56,44 %) ; néral (30,63 %) et géraniol (41,45 %) l'acide gérannique (48,75 %) et deux chémotypes pour les huiles essentielles de *C. madagascariensis*, caractérisés respectivement par le 1,8 cinéole (30,89 %) et l'oxyde de caryophyllène (26,60 %). L'étude de la CMI et de la CMB, déterminées par la méthode de microdilution, a montré que les huiles essentielles de deux *Cinnamosma* possèdent des effets bactéricides (CMB = CMI). Les huiles riches en fractions monoterpéniques (1,8 cinéole, linalol, néral et géraniol) montrent une plus faible CMI (0,63 mg/ml à 2,5 mg/ml) vis-à-vis des *Vibrio* spp. que celles riches en fractions sesquiterpéniques (oxyde de caryophyllène et acide gérannique), dont la CMI varie de 1,25 mg/ml à 5 mg/ml. Les trois types d'huile essentielle (néral et géraniol, oxyde de caryophyllène et acide gérannique), testés pour substituer les antibiotiques en aquaculture de crevette (*P. monodon*), ont un effet similaire à celui de l'antibiotique de réduire la charge en flore mésophile totale des larves. L'huile essentielle à néral et géraniol et à oxyde de caryophyllène (effet similaire à l'antibiotique) sont plus efficaces que l'huile essentielle à acide gérannique de réduire les charges en *Vibrio* sp. Les trois huiles essentielles ne donnent pas un taux de survie similaire à celui l'antibiotique, mais elles permettent de maintenir ce taux, à un niveau acceptable (> 69 %), largement supérieur au taux de survie du témoin (13,11 %).

Ayant la potentialité de contrôler la charge bactérienne dans des conditions *in vivo*, améliorant le taux de survie de larves de *P. monodon*, les huiles essentielles de *C. fragrans* et *C. madagascariensis* constituent une nouvelle alternative aux antibiotiques en aquaculture de crevettes

Mots clés : *C. fragrans*, *C. madagascariensis*, huiles essentielles, chémotypes, activités antimicrobiennes, charge bactérienne, taux de survie, aquaculture de crevette.

ABSTRACT

Essential oils of *Cinnamosma fragrans* and *Cinnamosma madagascariensis* were analyzed by GC-MS. The statistical analyses of data (ACP, CAH and AFD) allowed to distinguish four chemotypes of *C. fragrans* essential oils, dominated respectively by linalool (90.47 %); 1,8 cineole (56.44 %); neral (30.63 %) and geraniol (41.45 %) and geranic acid (48.75 %), and two chemotypes of *C. madagascariensis* essential oils, characterized respectively by 1,8 cineole (30.89 %) and caryophyllene oxide (26.60 %). Determined by the method of microdilution, study of MIC and MBC, showed that both *Cinnamosma* essential oils possesses bactericidal effects (MBC = MIC). Oil with higher content of monoterpene fractions (1,8 cineole, linalool, neral and geraniol) shows lowest MIC (0.63 mg / ml to 2.5 mg / ml) towards *Vibrio* spp. that those rich in sesquiterpene fractions (caryophyllene oxide and geranic acid) (MIC : 1.25 mg / ml to 5 mg / ml). Three types essential oils (neral and geraniol, caryophyllene oxide and geranic acid), tested to substitute antibiotics in shrimp hatchery (*P. monodon*); possess an effect similar that antibiotic to reduce total bacterial of larvae. Essential oil with neral and geraniol and essential oil with caryophyllene oxide (effect similar to the antibiotic) are more effective than essential oil with geranic acid to reduce *Vibrio* sp. Three essential oils does not give a survival rate similar that antibiotic, but they allow to maintain this rate, at acceptable level (> 69 %), widely higher than control (13.11 %).

Possessing the potentially to control the bacterial load *in vivo* conditions, thereby enhancing survival rate of *P. monodon* larvae, *C. fragrans* and *C. madagascariensis* essential oils constitutes a novel alternative to antibiotics in shrimp hatchery culture.

Key words: *C. fragrans*, *C. madagascariensis*, essential oils, chemotype, antimicrobial activity, bacterial control, survival rate, shrimp hatchery.